

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**EFFETS DES EXPOSITIONS AUX HERBICIDES
ATRAZINE ET GLYPHOSATE SUR DES LARVES
D'ÉPINOCHES À TROIS ÉPINES, *GASTEROSTEUS ACULEATUS***

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

Comme exigence partielle

du programme de la maîtrise en Océanographie

Par

Charline LE MER

18 Juin 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord exprimer de sincères remerciements à l'ensemble des personnes qui sont intervenues de près ou de loin au cours de mes deux années passées à l'Institut Maurice-Lamontagne (IML), tant professionnellement que personnellement.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Dr Robert Roy pour avoir accepté la direction de cette maîtrise. En me laissant intégrer son laboratoire d'écotoxicologie moléculaire, il m'a permis d'acquérir des connaissances en écotoxicologie et en endocrinologie. Sa confiance et son enthousiasme tout au long de cette maîtrise ont toujours été pour moi une force quant à l'avancement du projet. Son professionnalisme m'a permis de développer un esprit scientifique et critique. Ma participation à des congrès provincial et national a été un atout dans ma formation scientifique et à travers lesquels j'ai acquis une expérience professionnelle très enrichissante. Je fais également part de ma profonde reconnaissance au Dr Jocelyne Pellerin pour avoir pris la co-direction de ce mémoire et pour avoir été toujours disponible au cours des différentes étapes de la maîtrise.

Je voudrais adresser de sincères remerciements à Domynick Maltais qui a suivi de très près les dosages biochimiques. Il m'a fait part de ses petits secrets de laboratoire et m'a donné de très bons conseils qui au fil de nos discussions ont fait progresser ma réflexion.

Un très grand Merci à Bernadette Lagacé et Hélène Talbot, deux femmes formidables sans qui les bioessais n'auraient pas vu le jour.

Je remercie les membres du jury : Dr Réjean Trambly, Dr Jocelyne Hellou, Dr Jocelyne Pellerin et Dr Robert Roy pour avoir accepté de corriger ce mémoire.

Je remercie le Dr Wilfried Sanchez pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS, Verneuil-en-Halatte, France) lors d'un stage. Il m'a enseigné une technique biochimique, l'ELISA permettant de doser la protéine spiggin.

Je remercie également Alain Caron, chargé de cours à l'université du Québec à Rimouski (UQAR) pour son aide très précieuse en statistiques.

Merci à Bernard, Andréane et Donald pour leur agréable compagnie dans le bureau.

Merci à Bernard, Richard, Jérôme, François, Hélène... Sans eux, les dîners à l'IML n'auraient pas été les mêmes.

Je tiens aussi à adresser tous mes remerciements à l'Agence de Réglementation de la Lutte Antiparasitaire (ARLA) de Santé Canada ainsi qu'au NPRF (National Pesticide Research Fund) ; leur soutien financier m'a permis de mener à bien ce projet.

RÉSUMÉ

L'atrazine et le glyphosate sont parmi les herbicides les plus utilisés au Canada, cependant il y a relativement peu d'information concernant leur toxicité sur les poissons marins juvéniles. Nous avons sélectionné l'épinoche à trois-épines (*Gasterosteus aculeatus*) comme une espèce sentinelle pour l'estuaire du Saint-Laurent puisqu'il se reproduit dans des habitats cotiers sensibles durant l'été, la saison forte de l'utilisation des herbicides. De plus, les épinoches présentent des biomarqueurs pour les effets des contaminants à la fois estrogéniques (vitellogénine, VTG) et androgéniques (Spiggin, SPG). Des épinoches adultes collectées à un site de référence se sont reproduites au laboratoire et les œufs fertilisés ont été incubés jusqu'à l'éclosion. Les larves d'épinoches (<24 h) ont été exposées pendant 42 jours à quatre concentrations (0.1, 1, 10 et 100 µg/L) d'atrazine (ATR) et de glyphosate (GLY), à un témoin eau de mer, à un témoin solvant (acétone) et à deux témoins positifs pour les effets estrogéniques (0.05 µg/L éthinylestadiol, EE2) et androgéniques (3 µg/L dihydrotestostérone, DHT). Les survivants ont été mesurés (longueur, poids humide) puis conservés pour les analyses biochimiques de VTG et SPG. Il n'y avait pas d'effet significatif des expositions d'ATR et de GLY sur la survie ou la croissance larvaire, bien que la croissance était réduite à 1, 10 et 100 µg/L d'atrazine et montrait une légère dose-réponse. L'exposition à 3 µg/L DHT a eu un effet significatif sur la croissance (longueur du corps) mais n'a pas induit la SPG, possiblement à cause de la dégradation après le renouvellement de 24h. La VTG a été induite dans les larves exposées à l'EE2, cependant ni l'ATR et le GLY n'ont induit la production de VTG et de SPG. Nous concluons que ces herbicides ne montrent pas d'effets estrogéniques ou androgéniques sur de jeunes stades de vie d'épinoches à des concentrations environnementales réalistes.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	ii
Résumé	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations	ix
Publication & présentations.....	x
 Chapitre 1 : Problématique.....	 1
1.1. Contamination des milieux aquatiques	1
1.1.1. La pollution marine.....	1
1.1.2. Les pesticides	1
1.1.3. Transport des pesticides dans l'environnement marin.....	2
1.2. Situation des pesticides dans l'estuaire du Saint-Laurent	3
1.3. Herbicides sélectionnés pour le projet	7
1.3.1. Atrazine : utilisation et propriétés principales	7
1.3.2. Glyphosate : utilisation et propriétés principales.....	9
1.4. Toxicité des herbicides vis-à-vis des organismes aquatiques	10
1.4.1. Effets reportés de l'atrazine	10
1.4.2. Effets reportés du glyphosate.....	15

Chapitre 2 : Justifications des choix méthodologiques.....	18
2.1. Perturbateurs endocriniens.....	18
2.2. Intersexe.....	22
2.3. Notion de biomarqueurs.....	24
2.3.1. Biomarqueurs : définition	24
2.3.2. Vitellogénine : biomarqueur de la féminisation chez les poissons	24
2.3.3. Spiggin : biomarqueur spécifique des épinoches.....	26
2.4. Organisme de l'étude : l'épinoche à trois-épines	27
 Chapitre 3 : Objectifs & hypothèses	 32
3.1. Objectif principal.....	32
3.2. Objectifs spécifiques	32
3.3. Hypothèses principales	33
 Chapitre 4 : Article : “Effects of chronic exposures to the herbicides atrazine and glyphosate on larvae of the three-spined stickleback (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)”	 34
 Chapitre 5 : Discussion générale & Perspectives futures.....	 68
 Bibliographie	 83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Concentrations maximales des pesticides mesurées dans les rivières tributaires de l'ESL, à l'été 2003	4
Tableau 2	Measured concentrations ($\mu\text{g/L}$) of ATR, determined by ELISA, in fresh exposure solutions ($t = 0$) and the same solutions prior to renewal ($t = 24$) for experiments conducted in 2007 and 2008.....	62
Tableau 3	Measured concentrations ($\mu\text{g/L}$) of EE2 and DHT, determined by ELISAs, in fresh exposure solutions ($t = 0$) and the same solutions prior to renewal ($t = 24$) for experiments conducted in 2007 and 2008.	63

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Évolution des superficies traitées par certains herbicides (ha).....	6
Figure 2	Structure chimique de l'atrazine.....	8
Figure 3	Structure chimique du glyphosate	10
Figure 4	<i>Gasterosteus aculeatus</i> L.....	28
Figure 5	Scheme of experimental design for a) atrazine bioessay and b) glyphosate bioassay in 2007.....	64
Figure 6	Wet weights (mean \pm S.E.M.) of juvenile three-spined sticklebacks after 42 days of exposure to concentrations of atrazine and glyphosate in 2007	65
Figure 7	Wet weights (mean \pm S.E.M.) of juvenile three-spined sticklebacks after 42 days of exposure to concentrations of atrazine and glyphosate in 2008	66
Figure 8	Whole body VTG levels (mean \pm 2 S.D., in $\mu\text{g/g}$) in juvenile three-spined sticklebacks after 42 days of exposure to concentrations of atrazine and glyphosate in 2007 and 2008.	67

LISTE DES ABRÉVIATIONS

11-KT	11-kétotestostérone
17 α -MT	17 α -méthyltestostérone
ARLA	Agence de Réglementation de la Lutte Antiparasitaire
CL	Concentration létale
DHT	Dihydrotestostérone
E ₂	17 β -estradiol
EE ₂	17 α -éthynyl-estradiol
ESL	Estuaire du Saint-Laurent
GLY	Glyphosate
IML	Institut Maurice-Lamontagne
IV	Île-Verte
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration
MDDEP	Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs
MPO	Ministère des Pêches et Océans
NOEC	No Observed Effect Concentration
NPEO	Nonylphenols poly-ethoxylés
PEs	Perturbateurs endocriniens
PP	Pointe-au-Père
SPG	Spiggin
VTG	Vitellogénine

PUBLICATION & PRÉSENTATIONS

Les résultats rapportés dans ce mémoire ont donné lieu à des communications dans des congrès scientifiques provinciaux et nationaux ainsi qu'une publication qui sera soumise dans le journal **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**.

PUBLICATION

C. Le Mer, R.L. Roy, J. Pellerin et D. Maltais. 2008. Effects of chronic exposures to the herbicides atrazine and glyphosate on larvae of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). **Manuscrit**.

PRÉSENTATIONS ORALES

C. Le Mer. 2007. Effets des expositions d'atrazine et de glyphosate sur la reproduction d'épinoches à trois épines, *Gasterosteus aculeatus*, espèce sentinelle de l'estuaire du Saint-laurent. Présentation de devis de Maîtrise, Institut des Sciences de la Mer, Rimouski, QC. 16 Novembre 2007.

C. Le Mer, R.L. Roy, J. Pellerin et D. Maltais. 2008. Effets des expositions aux pesticides atrazine et glyphosate, sur des larves d'épinoches à trois-épines (*Gasterosteus aculeatus*). 12^{ème} colloque annuel Chapitre Saint-Laurent SRA – SETAC, Québec, QC. 29-30 Mai 2008.

C. Le Mer, R.L. Roy, J. Pellerin et D. Maltais. 2008. Effects of chronic exposures to the herbicides atrazine and glyphosate on larvae of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). 35^{ème} colloque annuel Aquatic Toxicity Workshop, Saskatoon, SK. 5 au 8 Octobre 2008.

C. Le Mer, R.L. Roy, J. Pellerin et D. Maltais. 2008. Effets des expositions aux pesticides atrazine et glyphosate, sur des larves d'épinoches à trois-épines (*Gasterosteus aculeatus*). 3^{ème} colloque annuel ECOBIM, Anse Saint-Jean, QC. 02-04 Juin 2009.

PRÉSENTATIONS AFFICHÉES

C. Le Mer, R.L. Roy et D. Maltais. 2007. Effects of pesticides on steroid production by gonadal tissues from the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) of the St. Lawrence Estuary. 34^{ème} colloque annuel Aquatic Toxicity Workshop, Halifax, N.S. 30 Septembre – 3 Octobre 2007.

C. Le Mer, R.L. Roy et D. Maltais. 2007. Effects of pesticides on steroid production by gonadal tissues from the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) of the St. Lawrence Estuary. 8^{ème} atelier TOXCEAN, Rimouski, QC. 27 Février 2008.

CHAPITRE 1 : PROBLÉMATIQUE

1.1. Contamination des milieux aquatiques

1.1.1. La pollution marine

Selon la définition donnée par le GESAMP (Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection) dans le cas particulier de l'environnement marin, le terme de pollution désigne l'introduction directe ou indirecte, par l'homme, de substances ou d'énergie dans le milieu marin (incluant les estuaires) lorsqu'elle a, ou peut avoir, des effets nuisibles. Le terme de polluant est donc associé à l'apparition dans le milieu d'effets délétères (dommages sur les ressources vivantes, sur les activités marines comme la pêche, sur la qualité de l'eau et toute autre activité reliée) et qui exerce une influence perturbatrice sur l'environnement marin.

1.1.2. Les pesticides

Les pesticides sont des substances, des matières ou des micro-organismes destinés à enrayer, détruire, amoindrir ou attirer les parasites au sens large, c'est-à-dire en fait les organismes indésirables considérés comme nuisibles. Ils sont principalement utilisés en agriculture dans le but d'éliminer des mauvaises herbes (herbicides) et de lutter contre les insectes nuisibles (insecticides) ou le développement de champignons pathogènes

(fongicides) (Giroux, 2004). Ils sont également utilisés pour le désherbage urbain (voies de communication) et domestique (protection d'ouvrages en bois ainsi que des matières textiles).

1.1.3. Transport des pesticides dans l'environnement marin

Les pesticides employés pour lutter contre les organismes nuisibles peuvent se retrouver dans l'environnement marin où ils risquent alors d'engendrer une contamination ponctuelle ou diffuse. Cette pollution diffuse semble être la source dominante d'apport de pesticides vers les eaux de surface et souterraines (Gilliom et al., 2006). Celle-ci peut être associée à plusieurs mécanismes de transport qui permettent aux pesticides de quitter la parcelle agricole et de se retrouver dans l'environnement marin. Les deux principaux mécanismes de transport des pesticides vers les eaux de surface et souterraines sont le ruissellement (pesticides sous forme dissoute ou lié à des particules de sols) et le lessivage. Les caractéristiques physicochimiques propres à chacun des pesticides - telles la persistance, l'adsorption, la pression de vapeur et la solubilité du pesticide - influencent sa tendance à quitter la parcelle. Les caractéristiques du sol et de la nappe d'eau souterraine, les précipitations et les méthodes d'application jouent également un rôle important sur les pertes de pesticides par ruissellement et lessivage. Le drainage du surplus d'eau qui s'infiltre dans les sols agricoles par les canaux de drainage souterrain entraîne aussi les pesticides vers les eaux de surface (Tellier, 2006).

Les pesticides peuvent aussi être transportés par l'air où lors de l'application les gouttelettes de pesticides dérivent et peuvent se retrouver à l'extérieur de la parcelle et, de ce fait, retomber dans l'environnement marin. Ils peuvent également se retrouver dans l'air sous forme de vapeurs, un phénomène appelé la volatilisation. En effet, après l'application de certains pesticides, ceux-ci sont libérés sous forme de gaz ou adhèrent à des particules comme les poussières. Par la suite, ces résidus de pesticides sous forme gazeuse peuvent être soustraits de l'atmosphère par condensation et retourner dans l'eau ou sur le sol par l'effet des précipitations ou par le dépôt de fines particules solides (Environnement Canada, 2001).

Une fois dispersés dans l'environnement, certains pesticides peuvent être dégradés par la lumière ou les micro-organismes, tandis que d'autres persistent et peuvent s'accumuler ou se transformer en d'autres contaminants parfois plus à risque que le produit d'origine (Comité permanent de l'environnement et du développement durable, 2000).

1.2. Situation des pesticides dans l'estuaire du Saint-Laurent

L'estuaire du Saint-Laurent (ESL) comprend de nombreuses zones côtières qui sont d'importantes aires de nourriture et de reproduction pour les espèces marines résidentes. Cependant, il reçoit régulièrement des entrées de pesticides provenant des rivières tributaires et des Grands Lacs, résultant du drainage des sols agricoles. Depuis 2002, Pêches et Océans Canada et l'ARLA (Santé Canada) évaluent les impacts des pesticides sur l'ensemble des milieux aquatiques du Canada. Des études écotoxicologiques ont été

menées à l'IML et visaient à déterminer la nature, les concentrations et les effets potentiels des pesticides présents dans l'estuaire du Saint-Laurent. Les prélèvements d'échantillons d'eau ont été effectués le long de la rive sud de l'estuaire du Saint-Laurent pendant plusieurs périodes estivales (2002-2006). Les échantillons étaient analysés pour déterminer la présence de 64 pesticides utilisant des méthodes analytiques permettant de détecter ces composés à des concentrations aqueuses supérieures à 10-30 ng/L.

Tableau 1 : Concentrations maximales des pesticides mesurées dans les rivières tributaires de l'ESL, à l'été 2003 (Couillard et al., 2006)

Pesticides	Critère(ng/L)	Concentrations maximales mesurées (ng/L)			
		Ile-Verte	Trois-Pistoles	Bic	Pointe-au-Père
Atrazine	1,800*	49	6	5	4
Desethyl-atrazine	Pas disponible	227	5	2	5
Simazine	10,000*	<20	30	90	30
Metolachlor	7,800*	3.6	3	3	8
Dicamba	10,000*	175	<1	<1	<1
Mecoprop	(13,000)	78	<1	<1	<1
2,4-D	(47,000)	<10	<10	<10	10
Carbofuran	1,800*	<5	<5	<5	38
Diazinon	(2)	70	<10	<10	30
*CCME critère pour la protection de la vie aquatique en eaux douces ()MENV critère provisoire pour l'environnement aquatique					

Les résultats, rassemblés dans le tableau 1, indiquent les plus fortes concentrations de pesticides mesurées dans les rivières affluentes. Dans l'ensemble, seulement 9 (Dicamba, Mecoprop, MCPA, 2,4_D, 2,4-DB, Atrazine...) des 64 pesticides non-persistants analysés sont détectés, à des concentrations généralement basses de l'ordre du

ng/L (Couillard et al., 2006). Cependant les contaminants étaient toujours présents sous forme de mélanges et certains composés étaient mesurés à tous les sites, comme par exemple l'herbicide atrazine. Les plus fortes concentrations se trouvaient au site de l'IV, un site agricole et les plus faibles se retrouvaient au Bic, le site de référence (Couillard et al., 2006).

Parallèlement, l'évaluation de la qualité chimique des eaux du fleuve Saint-Laurent a été réalisée par le Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs (MDDEP). En 1992, ce dernier instaure un programme de suivi environnemental des pesticides portant sur la culture du maïs (Giroux, 2002). De manière générale, les récents résultats (en 2002, 2003 et 2004) montrent que plusieurs pesticides sont souvent présents en même temps dans l'eau et que parmi les 60 pesticides et produits de dégradation analysés, 31 à 36 ont été détectés dans l'eau des rivières à l'étude (Giroux et al., 2006). Par rapport au bilan des années 1992 à 2001 (Giroux, 2002), les herbicides (notamment l'atrazine) sont encore les produits détectés le plus souvent dans les rivières retenues pour le suivi à long terme de la contamination. Quoique l'atrazine soit encore parmi les produits les plus utilisés au Québec et qu'elle soit toujours détectée dans 100 % des échantillons prélevés dans les rivières échantillonnées, sa concentration moyenne est significativement plus faible qu'au début du programme d'échantillonnage en 1992 (Figure 1). Cette baisse est cohérente avec la diminution de l'utilisation rapportée dans les bilans de ventes. (Giroux et al., 2006).

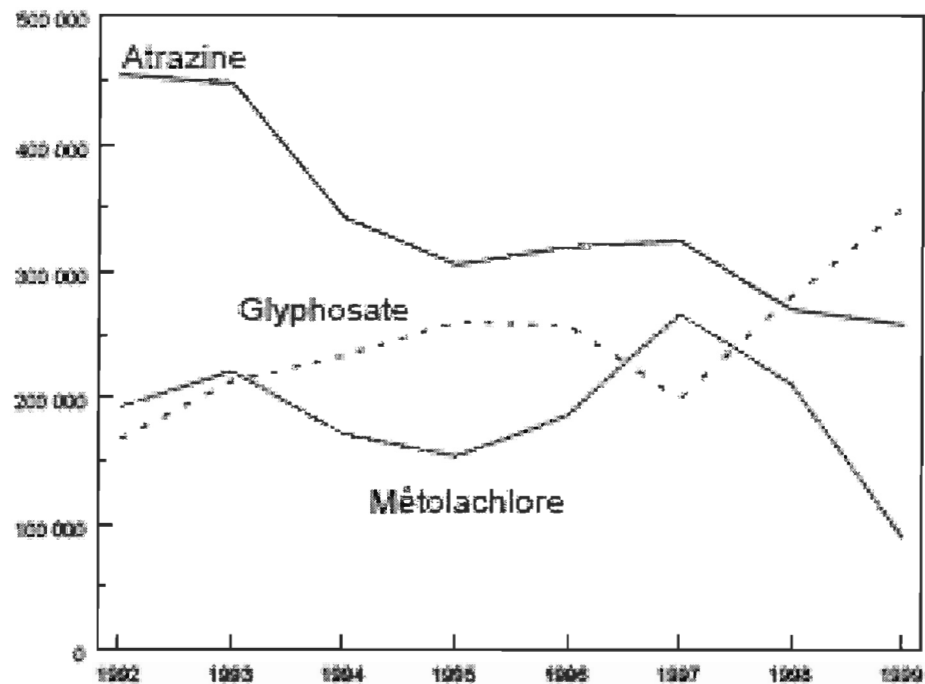


Figure 1. Évolution des superficies traitées par certains herbicides (ha) (Giroux et al., 2006)

Par ailleurs au cours des dernières années, l'utilisation croissante du glyphosate (Figure 1) fait que ce produit est apparu dans l'eau des rivières. En effet en 1999, le glyphosate devient l'herbicide utilisé sur les plus grandes superficies au Québec. Bien que le glyphosate soit utilisé dans différentes cultures et non seulement dans le maïs et le soya, l'augmentation notée du glyphosate est, entre autres, liée à l'utilisation des variétés de maïs et de soya transgéniques résistantes au glyphosate (Giroux, 2002). Puisqu'on les mesure seulement depuis quelques années, il n'est pas encore possible de faire une analyse des tendances temporelles pour la présence de ces produits dans l'eau. Toutefois, leur détection

dans l'eau constitue en elle-même une tendance à la hausse des concentrations (Giroux et al., 2006).

1.3. Herbicides sélectionnés pour le projet

Les deux pesticides sélectionnés pour cette étude sont l'atrazine et le glyphosate car leur utilisation dans l'agriculture au Québec est fortement répandue; ces deux composés sont également une des priorités majeures pour l'ARLA puisque peu de données sur les effets des organismes marins sont disponibles. Bien que sa concentration se trouve en dessous de la limite de détection (< 0.8 ng/L) dans les rivières tributaires du Saint-Laurent (Michel Leboeuf, chercheur scientifique, DSOE, Comm. Pers.), le glyphosate est le pesticide le plus utilisé depuis les années 2000 sur tout le territoire canadien, il représente 11 % des ingrédients actifs totaux (Tellier, 2006). En revanche l'atrazine est souvent détectée (à des niveaux faibles) dans la région de l'estuaire du Saint Laurent (49 µg/L avec son produit de dégradation déséthyl-atrazine, 227 µg/L _ Île-Verte) (Couillard et al., 2006).

1.3.1. Atrazine : utilisation et propriétés principales

L'atrazine (2-chloro-4-éthylamino-6-isopropyl-amino-1,3,5-triazine) est un herbicide de synthèse appartenant à la classe des triazines (figure 3). Disponible commercialement depuis 1958 (Eisler, 1989), elle est actuellement utilisée dans plus de 80 pays à travers le monde (Hayes et al., 2002) et est le pesticide le plus utilisé dans

l'agriculture en Amérique du Nord (DeNoyelles et al., 1982 ; Solomon et al., 1996 ; Bejarano et Chandler, 2003). Alors que dans certains pays Européens, la substance atrazine est interdite d'utilisation (ex : France depuis 2001; Brignon et Gouzy, 2007), au Canada elle est toujours utilisée, essentiellement pour combattre les mauvaises herbes dicotylédones et les graminées majoritairement dans le maïs, lequel est principalement cultivé dans l'écozone des plaines à forêts mixtes de l'Ontario et du Québec (ARLA, 2007). Son usage est cependant limité puisqu'elle résulte d'une surveillance accrue et a subi notamment plusieurs réévaluations depuis 1988 par l'ARLA. Un des résultats de cette surveillance a contribué à réduire les doses d'application (de 4,5 kg m.a./ha à tout au plus 1,5 kg m.a./ha pour le maïs) et à supprimer certains profils d'emploi (c'est-à-dire les utilisations industrielles et résidentielles) (ARLA, 2007).

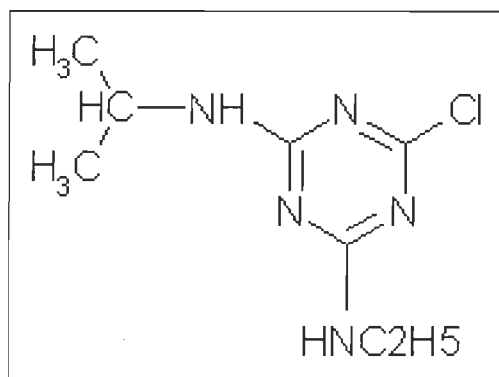


Figure 2: Structure chimique de l'atrazine

Source : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Atrazine>

L'atrazine est une substance cristalline blanche qui est vendue sous une variété de noms commerciaux. Elle est modérément soluble dans l'eau (33 mg/L à 27 °C) mais soluble dans plusieurs solvants organiques (acétone, méthanol) (Eisler, 1989). Dans l'eau, l'atrazine est dégradée par action microbienne aérobie et par hydrolyse, en ses résidus principaux, soit en ordre décroissant la déséthyl-atrazine, la diaminochloro-atrazine, la déisopropyl-atrazine ainsi que l'hydroxy-atrazine (USEPA, 2002). Dans les systèmes estuariens ou marins, l'atrazine s'est révélée non persistante à modérément persistante (TD_{50} = 3 à 120 jours) (ARLA, 2007). Les estuaires sont des zones particulièrement vulnérables à la pollution puisqu'ils reçoivent les contaminants des régions agricoles en amont et sont donc susceptibles d'être contaminés par l'atrazine (De Lorenzo et al., 2001).

1.3.2. Glyphosate : utilisation et propriétés principales

Le glyphosate (N-(phosphonométhyl)glycine) est un herbicide organophosphoré non sélectif et systémique. C'est le premier désherbant et actuellement le pesticide le plus vendu au Canada (Tellier, 2006). Il est utilisé en grande quantité dans les plantations forestières, pour le désherbage et la préparation du sol en vue de l'ensemencement de nouvelles cultures et également comme défoliant pour des cultures comme le blé, l'orge, les légumes, etc... (Giroux, 2004). Il est aussi employé comme désherbant domestique et urbain. Il est vendu principalement sous le nom de Roundup puisque le glyphosate n'est réellement que la matière active du produit.

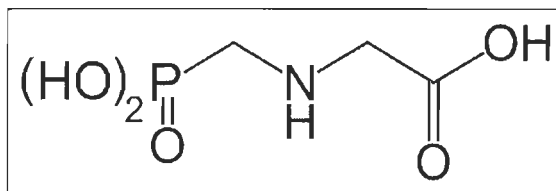


Figure 3 : Structure chimique du glyphosate

Source : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Glyphosate>

Le glyphosate est soluble dans l'eau (12 g/L à 25 °C) et il subit une dégradation microbienne rapide dans les eaux de surface naturelles. Dans les sols, le glyphosate subit une dégradation microbienne qui le métabolise en un acide aminométhylphosphonique (AMPA), qui se décompose ensuite lentement en dioxyde de carbone et en composés inorganiques simples. Le glyphosate seul est peu efficace car elle n'adhère pas aux feuilles ni ne les pénètre facilement. Pour accroître sa solubilité, il est donc habituellement préparé sous forme de sel d'isopropylamine ou bien des additifs (tensio-actifs) ou des surfactants lui sont ajoutés pour le fixer sur les plantes. Cette substance est très difficile à mesurer en raison de son absorption rapide sur les sols et difficile à extraire sans la dénaturer (Santé Canada, 1995).

1.4. Toxicité des herbicides vis-à-vis des organismes aquatiques

1.4.1. Effets reportés de l'atrazine

Les études sur les effets toxiques de l'atrazine chez les poissons ont indiqué une grande variabilité dans les réponses, dépendant de la dose et de l'espèce. La toxicité aigüe

de l'atrazine, définie comme étant la concentration létale moyenne qui tue 50 % des individus (CL 50) après 96 h, a été mesurée entre 3 et 45 mg/L pour les poissons en général (Elia et al., 2002). Les espèces qui se sont avérées les plus sensibles sont la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) en eau douce avec une CL 50 de 5.3 mg/L et le tambour croca (*Leiostomus xanthurus*) en milieu estuarien/marin avec une CL 50 de 8.5 mg/L (USEPA, 2002).

Bien qu'elle soit utilisée en agriculture principalement pour inhiber la photosynthèse des mauvaises herbes, l'atrazine affecte de nombreux processus physiologiques chez les animaux aquatiques. Brièvement, chez les invertébrés d'eaux douces, l'atrazine perturbe la balance hydrominérale et la fonction branchiale des crabes à de fortes concentrations (≥ 1 mg/L) (Prasad et al., 1990 ; Sylvestre et al., 2002). Chez les poissons, l'atrazine a été désignée pour altérer les paramètres hématologiques (Prasad et al., 1991 ; Hussein et al., 1996) et le métabolisme des Tilapias à des concentrations élevées (Grobler et al., 1989). Des concentrations sous-létales d'atrazine (100 μ g/L) chez les carpes communes (*Cyprinus carpio*) induisent une augmentation de glucose et de cortisol dans le sérum, mais aussi une diminution du glycogène dans les muscles et le foie (Gluth et Hanke, 1985). Des changements dans l'activité de la phosphatase alcaline sont observés dans le sérum, le cœur, le foie et les reins des carpes à des concentrations allant jusqu'à 6 mg/L suite à une exposition de 14 jours (Neskovic et al., 1993). Des augmentations des activités enzymatiques antioxydantes (SOD, GSH, GSSG, GST) supportent l'idée que l'atrazine en concentrations sous-létales (≥ 6 mg/ml) induirait un stress oxydatif dans le foie des crapet arlequin (*Lepomis macrochirus*) (Elia et al., 2002). Chez les truites arc-en-ciel

(*Oncorhynchus mykiss*), des concentrations d'atrazine de 10 à 160 µg/L causent une variété d'effets dans les tubules rénaux (Oulmi et al., 1995). Une étude a aussi révélé que l'atrazine peut engendrer des dommages aux reins chez la truite arc-en-ciel à des concentrations de 5 µg/l (Graymore et al., 2001). De plus, de faibles concentrations d'atrazine peuvent aussi entraîner des changements dans les comportements de nage et les habitudes de regroupement chez des espèces comme le poisson zèbre (*Brachydanio rerio*) (Steinberg et al., 1995) ou le poisson rouge (*Carassius auratus*) (Saglio et Trijasse, 1998). De même qu'une concentration aussi faible que 0,5 µg/l d'atrazine induit des effets d'interférence olfactive chez le saumon atlantique (*Salmo salar*) (Moore et Waring, 1998).

Les embryons ou larves de poissons montrent, particulièrement pendant certains stades du développement, une haute sensibilité envers les contaminants. Comparés aux poissons adultes, les effets sous-létaux peuvent être détectés plus facilement au cours des premiers stades ontogénétiques dûs à l'augmentation de la sensibilité et des divers critères d'évaluations facilement accessibles (Luckenback et al., 2001). À des concentrations létales, l'atrazine cause des retards dans l'organogenèse, des ralentissements dans les mouvements et des perturbations fonctionnelles dans le cœur et le système circulatoire des embryons de poissons-zèbres (*Danio rerio*) (Wiegand et al., 2000). Récemment, des expositions sur des saumons atlantiques juvéniles ont montré que 9 % des poissons exposés pendant 3 mois à 100 µg/L étaient morts et que les survivants avaient un appétit réduit après 10 jours d'exposition et un retard de croissance (Nieves-Puigdollér et al. 2007). Des concentrations de 40 et 80 µg/L réduisent significativement le taux de croissance, rendent les larves de tambour rouge (*Sciaenops ocellatus*) hyperactives et

modifient leurs activités de nage après une exposition de 4 jours (Alvarez et Fuiman, 2005). Également des expositions de 24h à des concentrations aussi basses que 0.5-5 µg/L d'atrazine induiraient des changements comportementaux dans les activités de nage des poissons rouges juvéniles, tels qu'une diminution significative du comportement de regroupement et une augmentation de l'activité natatoire en surface (Saglio et Trijasse, 1998). Dernièrement, l'atrazine affecterait la balance osmotique des larves de choquemorts puisque après une exposition de 96 h il a été observé une augmentation de déshydratation des larves exposé à ≥ 5 µg/L (Fortin et al., 2008).

La possibilité d'interactions entre l'atrazine et le système endocrinien ou reproducteur des organismes est le centre d'intérêt de plusieurs études. Certains auteurs mentionnent donc le rôle possible de l'atrazine comme perturbateur endocrinien. Chez les humains, des expositions à long terme à des chlorotriazines (atrazine, simazine et cyanazine) peuvent accroître le risque de cancers du sein (Kettles et al., 1997). Chez les rats, des rapports ont indiqué des interactions de l'atrazine avec l'axe gonadique hypothalamo-hypophysaire (Stoker et al., 1999; Cooper et al., 2000). Des études *in vitro* ont aussi montré l'induction de l'activité de l'aromatase (l'enzyme responsable de la synthèse des estrogènes) dans des lignées cellulaires humaines (Sanderson et al., 2000, 2001). L'induction de l'aromatase a aussi été reportée pour se produire chez des alligators mâles juvéniles suite à une exposition survenant juste après l'éclosion (Crain et al., 1999).

De nombreuses études de toxicité ont mis en évidence des effets de faibles concentrations d'atrazine sur le système reproducteur des amphibiens. Ainsi, Tavera-Mendoza et ses collaborateurs (2002) ont montré que des têtards de *Xenopus laevis*, exposés pendant 48h à seulement 21 µg/L d'atrazine pendant la différenciation sexuelle, manifestaient très tôt une réduction considérable du développement des gonades mâles, causant chez une partie importante des individus exposés une résorption du tissu testiculaire. Cette dose a été auparavant désignée comme étant une concentration à non effet écologique observé pour l'atrazine (Solomon et al., 1996). De plus, Hayes et ses collaborateurs (2002) ont montré que l'atrazine causait des anomalies gonadiques et pouvait introduire des cas d'intersexe, et enfin démasculinisait le larynx des *Xenopus laevis* mâles exposés pendant le développement larvaire après une exposition s'étalant de 0.01 à 200 ppb. En contraste à ce travail, Carr et ses collaborateurs (2003) observaient seulement un léger effet de ce composé sur un test à des doses similaires sur la même espèce (*X. laevis*); <5% de la population était hermaphrodite après une exposition à 25 µg/L d'atrazine durant la période critique de la différenciation sexuelle.

Chez les poissons rouges mâles (*Carassius auratus*), une exposition de 21 jours à une concentration de 1000 µg/L a engendré des diminutions à la fois des concentrations de testostérone et de 11-kétotestostérone ainsi que des augmentations des concentrations de 17β-estradiol (E₂ ; Spano et al., 2004). Cette même étude a souligné la présence de taux élevé d'atrésie des ovaires à de fortes concentrations (100 et 1000 µg/L) ainsi que des altérations structurelles des testes à 1000 µg/L. Des concentrations de 3.6 et ≥ 6 µg/L

affecteraient les concentrations plasmiqes de testostérone et de 11-kétotestostérone respectivement. L'atrazine affecterait également l'accumulation de stéroïdes dans la bile et causeraient des impacts directs sur les testes, en modifiant les productions de 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one et des androgènes (Moore et Waring, 1998).

1.4.2. Effets reportés du glyphosate

Dû à sa forte solubilité dans l'eau et à son usage intensif dans l'environnement (spécialement dans les systèmes en eaux peu profondes), l'exposition de cet herbicide à des organismes aquatiques non cibles est une préoccupation des écotoxicologues (Tsui et Chu, 2003). A l'heure actuelle, les données de la toxicité aigüe du glyphosate sur les organismes aquatiques sont minces dans la littérature puisqu'il est nouvellement apparu dans les milieux aquatiques. On dénombre une trentaine d'ouvrages répertoriant les effets du glyphosate ou du Roundup® sur les organismes aquatiques. La LC₅₀ après une exposition de 96h au Roundup varie de 2 à 55 mg/L, dépendant de l'espèce de poisson, du stade de vie et des conditions du test (Jiraungkoorskul et al., 2002). Comme par exemple chez des poissons néotropicaux (*Prochilodus lineatus*), la LC₅₀ a été déterminée à 13.69 mg/L (do Carmo Langiano et al., 2008).

Chez les invertébrés aquatiques, il fut démontré que le glyphosate affecte la reproduction et le développement des escargots (*Pseudosuccinea columella*) à des

concentrations sous-létales (Tate et al., 1997) ainsi que le cycle de régulation des oursins (*Sphaerechinus granularis*) (Marc et al., 2002). Également, la fonction cardiaque et les paramètres du stress oxydatif des têtards de grenouille (*Lithobates catesbeiana*) seraient perturbés après une exposition de 48 h à 1 ppm de glyphosate (Costa et al., 2008).

On retrouve également des études sur les effets sévères du glyphosate surtout chez des espèces de poissons d'eau douce. Plusieurs auteurs (Neskovic et al., do Carmo Langiano et al., Szarek et al., Glusczak et al.) ont affirmé que de fortes concentrations de glyphosate induiraient des altérations histologiques dans le foie des poissons perturbant le fonctionnement normal de l'organe. En effet, des augmentations de l'activité de plusieurs enzymes dans le rein et le foie des carpes (*Cyprinus carpio*), ainsi que de l'hyperplasie épithéliale ont été observées (Neskovic et al., 1996). Une autre étude, exposant des carpes au Roundup en concentrations létales, a révélé que le glyphosate causerait une apparition de structures tels que des myélines dans les hépatocytes, un gonflement des mitochondries et une disparition de la membrane externe des mitochondries (Szarek et al., 2000). Le taux plasmique de glucose indiquant une réponse typique au stress ainsi que l'activité catalytique hépatique, suggérant l'activation des défenses antioxydantes, seraient élevés chez une espèce de poissons néo-tropicaux (*Prochilodus lineatus*) après une exposition à 10 mg/l de glyphosate (do Carmo Langiano et al., 2008). De fortes concentrations de glyphosate (3 à 20 mg/L) suite à une exposition de 96 h sur des bogas (*Leporinus obtusidens*) provoquent une baisse significative de l'activité de l'Ache dans le cerveau et de la lactate dans le foie, une augmentation significative du glycogène et du glucose dans le foie ainsi que du taux d'ammoniaque à la fois dans les muscles et dans le foie (Glusczak et

al., 2006). Dernièrement une étude a montré que des concentrations de glyphosate (0.2 et 0.4 mg/L) affecteraient les paramètres métaboliques et la production de TBARS dans le foie de *Rhamdia quelen* juvéniles (Gluszczak et al., 2007). Des expositions à long terme de glyphosate à des concentrations sous-létales (5 et 15 ppm) ont montré des effets histopathologiques et biochimiques chez une espèce de cichlidés (*Oreochromis niloticus*) (Jiraungkoorskul et al., 2003). Récemment, Çavaş et Könen (2007) ont dénoté que des concentrations de 5, 10 et 15 ppm de glyphosate causeraient des dommages dans les érythrocytes des poissons rouges (*Carassius auratus*).

Quelques auteurs se sont intéressés tout particulièrement aux effets du glyphosate sur la croissance ou sur la reproduction des organismes d'eau douce. Il fut démontré que le glyphosate (1 mg/L) provoquerait une croissance plus rapide à la troisième génération d'embryons d'escargots (Tate et al., 1997). Il a été également noté que des concentrations de 0.1 et 10 mg/L de glyphosate affecteraient la reproduction des escargots (*Pseudosuccinea columella*) en induisant des anomalies et des polyembryonies ainsi que l'éclosion serait inhibée à 10 mg/L (Tate et al., 1997). Une étude sur les cellules humaines placentaires a démontré que le glyphosate perturbe l'activité de l'aromatase et les niveaux d'ARNm (Richard et al., 2005).

CHAPITRE 2 : JUSTIFICATION DES CHOIX MÉTHODOLOGIQUES

2.1. Perturbateurs endocriniens

Le système endocrinien est la voie principale par laquelle les organismes multicellulaires contrôlent leurs fonctions biochimique, reproductive, physiologique et développementale. C'est un système très complexe orchestré par le cerveau via l'hypothalamus et l'hypophyse, utilisant des hormones qui agissent en tant que messagers chimiques.

Beaucoup de produits chimiques, produits par les activités humaines et originaires de sources industrielles, domestiques et agricoles finissent dans l'environnement aquatique. Il est maintenant connu que les poissons, vivant dans des aires polluées, peuvent être continuellement exposés tout au long de leur vie à une multitude de ces produits ayant le potentiel d'affecter le système endocrinien. Un perturbateur endocrinien (PE) est alors défini comme « une substance exogène ou un mélange qui altère les fonctions du système endocrinien et conséquemment qui cause des effets adverses sur la santé dans un organisme entier ou sa progéniture » (European Commission, 1997). Lors de la dernière décade, les recherches sur l'identification et les effets de tels produits chimiques sont devenues une composante majeure de la toxicologie environnementale et ont attiré l'attention du public.

Les PEs englobent une multitude de mécanismes d'action, incluant des effets sur la croissance, le comportement, la reproduction et la fonction immunitaire (Allen et al., 1999). Les PEs peuvent être classés suivant leur mode d'action : (1) ils peuvent imiter les effets des hormones endogènes telles que les androgènes et les estrogènes, (2) ils peuvent

antagoniser les effets des hormones endogènes, (3) ils peuvent altérer la synthèse et le métabolisme des hormones endogènes et (4) ils peuvent perturber la synthèse et le métabolisme des récepteurs hormonaux (Sonnenschein et Soto, 1998). De loin, les types de P.Es les plus intensivement étudiés concernent les substances qui imitent ou antagonisent les hormones stéroïdiennes au niveau de leur récepteur moléculaire (c'est-à-dire une action agoniste ou antagoniste). On distingue alors les substances qui imitent ou bloquent l'estradiol sont qualifiées respectivement d'estrogènes ou d'antiestrogènes; celles qui imitent ou bloquent la testostérone sont qualifiées d'androgènes ou d'antiandrogènes. Ces composés chimiques qui interagissent directement avec des récepteurs stéroïdiens ont le potentiel de produire des effets à d'extrêmes basses concentrations. Puisque les hormones stéroïdiennes gonadiques contrôlent et régulent le développement embryonnaire et la différenciation sexuelle, c'est durant cette période que les effets des PEs peuvent être particulièrement sévères (Matthiessen et al., 2002).

La plupart des études sur les PEs ont étudié les effets des contaminants qui engendrent un effet féminisant. Ce sont des substances estrogéniques naturelles ou xénobiotiques entrantes et présentes dans l'environnement aquatique qui perturbent la reproduction des poissons et d'autres animaux (Toppari et al., 1996). Des estrogènes endogènes naturels, tels que l'estrone et le 17β -estradiol (E_2), aussi bien que l'estrogène synthétique 17α -éthinyloestradiol (EE_2) ont fréquemment été détectés dans des effluents d'usines de traitements des eaux usées domestiques en Europe, en Amérique du Nord et en Australie (Desbrow et al., 1998; Belfroid et al., 1999; Ternes et al., 1999; Braga et al., 2005; Johnson et al., 2005; Servos et al., 2005). Les concentrations des estrogènes

retrouvées dans les effluents sont de l'ordre du ng/L. Les décharges d'eaux usées domestiques ont été identifiées comme une cause majeure d'effets œstrogéniques chez les poissons d'eaux douces de GB et d'USA (Purdom et al., 1994; Folmar et al., 1996). Les effluents d'usines de pâtes et de raffinerie pétrolière ont aussi été démontré comme responsable de la féminisation chez les poissons (Mellanen et al., 1999; Tremblay et Van der Kraak 1999; Van den Heuvel et Ellis, 2002; Knudsen et al., 1997).

Les effets œstrogéniques chez les poissons, à la fois en laboratoire et sur le terrain, ont été extrêmement bien documentés. Ces substances œstrogéniques causent une féminisation inappropriée des poissons mâles dont l'un des effets majeurs est l'induction de la protéine femelle, la vitellogénine (VTG) chez les mâles et les poissons immatures (Folmar et al., 1996; Lye et al., 1997; Tyler et Routledge, 1998; Kime et al., 1999). D'autres effets ont été rapportés tels qu'un développement gonadique anormal (Jobling et al., 1996, 1998; Gimeno et al., 1996) et des altérations dans les taux des hormones stéroïdiennes (Folmar et al., 1996). Cependant, il a été démontré que l'exposition aux oestrogènes est accompagnée dans la plupart des cas par la présence de la condition d'intersexe dans les gardons sauvages (Jobling et al., 1998)

Bien que les oestrogènes aient reçu plus d'attention, un nombre croissant de composés anthropiques, aux propriétés androgéniques ou antiandrogéniques, ont été détectés dans l'environnement aquatique. Dans un estuaire recevant des décharges d'effluents d'eaux usées, le 4-androstenedione et son métabolite 5 α -androstanedione, étaient identifiés, à hauteur de 105 et 96 ng/L respectivement, comme participants majeurs à l'activité androgénique (Thomas et al., 2002). Également en Suède, des effluents d'usines

de pâtes et papiers ont été désignés pour manifester de l'androgénicité (Svenson et Allard., 2004). L'androstenedione, ainsi que la testostérone ont été détectées dans des effluents de plusieurs usines de traitements des eaux usées domestiques au USA (Kolodziej et al., 2003), dans des effluents d'usines de pâte (Jenkins et al., 2001, 2003; Durhan et al., 2002) et dans des ruisseaux recevant des écoulements provenant de zones agricoles (Kolodziej et al., 2004; Shore et al., 2004). Dans une étude de 139 ruisseaux des USA couvrant une grande partie du pays, la testostérone était mesurée à une concentration maximale de 214 ng/L, avec une concentration médiane de 116 ng/L (Kolpin et al., 2002).

Une des plus nettes observations du potentiel androgène dans l'environnement aquatique a été faite chez les femelles Gambusie (*Gambusia affinis*), habitant en aval des décharges d'effluents de papeteries en Floride. Elles ont développé des appendices de nageoires anales (gonopodes) qui sont normalement uniquement trouvés chez les mâles (Howell et al., 1980; Howell et Denton, 1989; Cody et Burton 1997). La cause de cette masculinisation reste encore inconnue et le composé responsable n'a pas encore été identifié; cependant certains auteurs ont émis des spéculations (Denton et al., 1985; Parks et al., 2001; Durhan et al., 2002). Par la suite, d'autres effets masculinisants de ces composés androgéniques (et aussi anti-androgéniques) présents dans l'environnement aquatique ont été rapportés sur les poissons. En Suède, des modifications dans le sexe ratios de mâles ont été découverts chez des loquettes d'Europe (*Zoarces viviparous*) à proximité d'une sortie d'effluents d'usines de pâtes (Larsson et al., 2000; Larsson et Forlin, 2002). Une autre étude a révélé une diminution de la taille de la gonade des poissons femelles habitant près d'une zone côtière recevant des effluents de papeterie blanchis

(Andersson et al., 1988). Chez les épinoches, des effets androgéniques ont aussi été détectés sur des femelles, exposées en laboratoire pendant 6 semaines à des effluents d'usines de pâtes, tels que la production de la protéine spécifique des mâles la spiggin (SPG) ainsi qu'une augmentation de la hauteur des cellules épithéliales (Katsiadaki et al., 2002b). De plus, de nombreux pesticides ont une activité anti-androgénique tels le fenitrothion, le vinclozolin, le linuron, le DDT et ses métabolites (Gray et al., 1999; Makynen et al., 2000; Tamura et al., 2001).

2.2. Intersexe

L'intersexualité (ou intersexe) est définie comme une condition qui se produit parfois chez des espèces gonochoriques et qui est caractérisée par la présence, à l'intérieur d'une gonade, de cellules typiques du sexe opposés qualifiées d'ovo-testis ou de testis-ova (Sadovy et Shapiro, 1987). Cette condition peut se produire spontanément ou peut être induite sous certaines conditions environnementales, principalement la température ou par des traitements à des hormones stéroïdiennes (Hahlbeck et al., 2004a). Cependant l'intersexualité n'est pas considérée comme étant une partie du cycle de vie naturel des organismes. Des recherches ont montré des cas très répandus d'intersexe dans les populations de gardons sauvages résidant dans des rivières en G.B, caractérisés par l'apparition d'oocytes dans les testes (Jobling et al., 1998; Nolan et al., 2001). Ces auteurs ont également affirmé que l'apparition de l'intersexe dans ces populations de gardons était fortement corrélée avec la proximité de ces poissons à des rejets à caractère œstrogénique

des effluents d'usines de traitements des eaux usées. Par la suite, des études d'expositions en laboratoire d'effluents d'usines de traitements d'eaux usées sur des gardons ont montré des augmentations des taux de VTG et la féminisation du système reproducteur (Rodgers-Gray et al., 2001; Liney et al., 2005). L'intersexe dans des gardons sauvages a été aussi rapporté dans d'autres pays européens incluant la Finlande, la Suède et le Danemark (Wiklund et al., 1996; Andersen et al., 2001, Bjerregaard et al., 2005). L'intersexe a aussi été décrit chez d'autres espèces de poissons sauvages, telles que le barbeau (*Barbus plebejus*), la Brème (*Abranis brama*), le gougeon (*Gobio gobio*), la plie (*Platichthys flesus*), la carpe (*Cyprinus carpio*), la perche (*Perca fluviatilis*), la loquette d'Europe (*Zoarces viviparus*) et l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) (Vigano et al., 2001; Vethaak et al., 2002; Van Aerle et al., 2001; Hashimoto et al., 2000; Matthiessen et al., 1998, Allen et al., 1999; Solé et al., 2002; Gercken et Sordyl, 2002).

Bien que la présence d'intersexe dans un individu soit souvent considérée anormale, certaines espèces de poissons (spécialement des cyprinidés) présentent un niveau bas d'intersexe qui semble être normal. Comme par exemple chez la carpe (Komen et al., 1989), la perche (Jobling et al., 1998), la daurade (Hecker et al., 2002) et aussi chez les bars où des niveaux d'intersexe de 2-4% ont été retrouvés dans les contrôles (Blazquez et al., 2001). De plus, l'intersexe peut se manifester également dans des poissons traités avec des stéroïdes. En effet, des carpes exposées à de l'estradiol présentaient à la fois des tissus ovarien et testiculaire souvent mélangés dans les gonades, alors que quand l'intersexe se produit dans des individus non traités, on distingue les tissus ovariens et des tissus testiculaires séparés par un tissu conjonctif (Komen et al., 1989).

2.3. Notion de biomarqueurs

2.3.1. Biomarqueurs : définition

Des biomarqueurs sont actuellement utilisés dans la surveillance environnementale comme premiers signaux d'avertissements de pollution. Ils permettent le suivi de la qualité des milieux et l'état de santé des individus dans le temps et dans l'espace en évaluant les polluants biodisponibles et leurs effets. Le concept de biomarqueur se définit alors comme un changement dans une réponse biologique (au niveau moléculaire, cellulaire, ou physiologique) qui peut être rapporté à une exposition ou à un effet toxique de contaminants environnementaux (Peakall, 1994).

Dernièrement, quelques auteurs ont démontré l'utilité d'une approche multi-biomarqueurs pour la bio-surveillance environnementale chez plusieurs espèces de poissons d'eaux douce (Triebkorn et al., 2001; Galloway et al., 2004; Sanchez et al., 2007, 2008b, 2008c). Cette approche est basée sur la mesure d'une série de biomarqueurs complémentaires permettant ainsi de prendre en compte la grande diversité des contaminants et la multiplicité de leurs effets.

2.3.2. Vitellogénine : biomarqueur de la féminisation chez les poissons

La vitellogénine est une protéine qui sert de précurseur majeur à la production des réserves nutritives de l'œuf chez les vertébrés ovipares. Cette glycolipophosphoprotéine dimérique est produite par le foie sous la stimulation des estrogènes et plus

particulièrement le 17 β -œstradiol pendant le processus de la vitellogénèse et est spécifique de la maturation des femelles. Une fois synthétisée, elle est ensuite transportée par voie sanguine jusqu'aux ovaires où elle est incorporée, par endocytose, aux oocytes en développement. Elle est ensuite clivée en deux petites protéines, phosvitine et lipovitelline (Covens et al., 1987).

A la fois les poissons mâles et femelles ainsi que les juvéniles, possèdent le récepteur hépatique aux estrogènes, mais la VTG sera exprimée, en condition normale, uniquement dans le foie des femelles. Cependant, des composés xénobiotiques estrogéniques peuvent aussi agir sur les récepteurs hépatiques induisant ainsi la synthèse de vitellogénine aussi bien chez les femelles que chez les mâles et les juvéniles. Toutefois, de nombreuses études ont montré des variations des teneurs en VTG suite à des expositions à des composés estrogéniques environnementaux. Cette production de VTG est donc dépendante de la quantité du xénobiotique présent dans l'environnement (Sumpter et Jobling, 1995). De ce fait et bien qu'en conditions normales le taux de VTG chez les poissons mâles est très bas, voire même indétectable, l'induction de VTG chez les poissons mâles et chez les juvéniles est un excellent biomarqueur pour l'évaluation du potentiel estrogénique des composés chimiques et de l'exposition des animaux aux contaminants estrogéniques présents dans les environnements aquatiques (Purdom et al., 1994; Sumpter and Jobling, 1995; Tyler et Routledge., 1998; Denslow et al., 1999).

Actuellement, la VTG a été purifiée, identifiée et caractérisée dans de nombreux poissons. De par ses avantages comme sa rapidité et sa sensibilité, les ELISAs sont les méthodes de dosage les plus utilisées pour les mesures de VTG et ont été développées chez

un grand nombre d'espèces de poissons comme chez la loquette d'Europe, *Zoarces viviparus* (Korsgaard et Pedersen, 1998), le poissons-zèbre, *Danio rerio* (Holbech et al., 2001; Brion et al., 2002; Nilsen et al., 2004), le vairon à tête de boule, *Pimephales promelas* (Parks et al., 1999; Mylchreest et al., 2003; Nilsen et al., 2004; Tatarazako et al., 2004; Eidem et al., 2006), la daurade, *Acanthopagrus schlegeli* (Chang et al., 1996), la truite de rivière, *Salmo trutta* (Sherry et al., 1999), la sole, *Solea vulgaris* (Rodriguez et al., 1989), le bar rayé, *Morone saxatilis* (Kishida et al., 1992), la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* (Bon et al., 1997; Christiansen et al., 2000), la carpe, *Cyprinus carpio* L. (Carnevali et al., 2003) et la plie lisse, *Pleuronectes putnami* (Roy et al., 2004).

2.3.3. Spiggin : biomarqueur spécifique des épinoches

Lors de la saison de reproduction, les reins des épinoches mâles s'hypertrophient et produisent une protéine, qui sert de substance collante dans la construction du nid (Jakobsson et al., 1999). Elle a une masse moléculaire de 203 kDa et est appelée spiggin (SPG, du nom suédois pour l'épinoche, le spigg) (Jakobsson et al., 1999; Jones et al., 2001). Cette dernière est synthétisée précisément par les cellules épithéliales du second tubule proximal et par les tubes collecteurs du rein (De Ruiter et Mein, 1982). Son expression est induite en réponse aux androgènes, en particulier la 11-kétotestostérone (Borg et al., 1993). La SPG est une glycoprotéine hautement hydrophobe, constituée de trois monomères distincts qui sont excrétés vers la vessie. Ces sous-unités vont s'assembler pour former un agglutinat visqueux insoluble dans l'eau par un mécanisme appelé la

multimérisation conservée (Jones et al., 2001). La SPG est alors stockée dans la vessie jusqu'à son excrétion pour la construction du nid où elle y sert de matériaux filamenteux adhésifs et fortement élastiques (De Ruiter et Mein, 1982).

Alors qu'il manquait un test biochimique sensible permettant de détecter les androgènes environnementaux, récemment un ELISA a été développé chez l'épinoche à trois épines pour doser la SPG à la fois *in vivo* dans des échantillons de plasma (Katsiadaki et al., 2002a; Sanchez et al., 2008a) ainsi que dans des homogénats de corps entiers de larves (Hahlbeck et al., 2004b) et par après dans des tests cellulaires *in vitro* (Jolly et al., 2006; Bjorkblom et al., 2007). La SPG est spécifique des *Gasterosteidae* car elle est produite naturellement chez les épinoches mâles. Cependant, il a été récemment démontré que les reins des épinoches femelles et des juvéniles produiraient de la SPG suite à une exposition à des androgènes dans l'eau (Katsiadaki et al., 2002a, 2002b; Hahlbeck et al., 2004b). Des tests *in vivo* et *in vitro* ont également été développés et utilisés avec succès pour mesurer les effets des contaminants aux activités anti-androgéniques tel que le flutamide (Jolly et al., 2006; Katsiadaki et al., 2006).

2.4. Organisme de l'étude : l'épinoche à trois-épines

L'épinoche à trois-épines, *Gasterosteus aculeatus*, est l'une des espèces non commerciales les plus étudiées. En partie en raison de son abondance, de sa large distribution et de sa facilité à être échantillonnée mais, plus que ça, de son unique gamme

de caractéristiques comportementales et morphologiques, ce petit poisson téléostéen a attiré l'attention des chercheurs depuis plusieurs décades. A date, la communauté de chercheurs sur l'épinoche a produit une des plus grandes littératures de recherche pour un organisme de modèle vertébré non mammalien, incluant plus de 2000 articles scientifiques et plusieurs manuels sur son histoire de vie, son comportement, sa morphologie, sa distribution et son écologie. Bien que le comportement reproducteur de l'épinoche ait été beaucoup étudié depuis des années, cette espèce a un intérêt attirant et grandissant dans des domaines émergents de biologie telle que l'écotoxicologie.

L'épinoche est un poisson téléostéen, appartenant à la famille des *Gasterosteidae*, très répandu dans toutes les zones tempérées de l'hémisphère Nord (Pall et al., 2002). Par son cycle de vie, c'est une espèce qui supporte une large gamme à la fois de températures et de salinités puisqu'on le retrouve aussi bien en eau douce dans les lacs et les cours d'eau, que dans les eaux estuariennes et marines.



Figure 4: *Gasterosteus aculeatus* L.

Source : http://www.diablesdesmers.qc.ca/faune_et_flore/epinoche_3_epines.htm

Au Québec, les épinoches migrent annuellement vers l'estuaire du Saint-Laurent dès que la température de l'eau commence à se réchauffer. À la fin du printemps, ils se retrouvent dans des zones intertidales salées peu profondes, appelées marelles, pour se reproduire (Whoriskey et Fitzgerald, 1989). Les périodes d'épandage des herbicides (entre

autre atrazine et glyphosate) sur les cultures se produisent au printemps et à l'été coïncidant avec le pic de la saison de reproduction des épinoches. Il est donc fort probable que les larves d'épinoches soient exposées aux contaminants dès leurs plus jeunes stades de vie.

De part sa diversité remarquable de comportements lors de la reproduction, l'épinoche est devenue une importante espèce modèle pour étudier le lien entre le contrôle hormonal et le comportement reproducteur chez les poissons. L'épinoche, poisson reproducteur à répétition, a un cycle de reproduction saisonnier dans lequel la spermatogenèse et le développement des caractères sexuels secondaires chez le mâle sont temporairement séparés (Borg, 1982a). L'épinoche mâle manifeste un comportement très particulier pendant la période de reproduction (fin du Printemps - mi-Juillet) où de nombreux caractères sexuels secondaires sont visibles tels que les yeux bleus, le ventre rougeâtre et l'hypertrophie de ses reins. Ces derniers sécrètent alors une protéine « collante » appelée la SPG qui est utilisée dans la construction du nid (Jakobsson et al., 1999) et dans lequel les femelles pondent leurs œufs. Ces caractéristiques sexuelles sont induites sous l'action des androgènes principalement la 11-ketotestostérone (Borg, 1993). À la fin de la saison de reproduction, quand les niveaux d'androgènes s'abaissent (Mayer et al., 1990) et les caractères sexuels secondaires régressent, la spermatogenèse commence. Alors que chez les femelles, c'est la sécrétion de la vitellogénine (VTG) qui prend place durant l'ovogenèse.

L'épinoche à trois-épines, *Gasterosteus aculeatus*, a été choisie comme espèce sentinelle puisqu'elle présente plusieurs avantages qui la rendent pertinente pour des études écotoxicologiques. D'une part, son abondance dans l'estuaire du Saint-Laurent et sa petite taille permettent la collecte plus facile d'un grand nombre d'individus et la prêtent très bien

à des expositions *in situ* ou en laboratoire. De plus, c'est une espèce euryhaline, robuste et facile à maintenir en laboratoire dont l'activité reproductrice peut être contrôlée par des manipulations de la température et de la photopériode (Baggerman, 1980; Borg et al., 1982a, 1982b, 1987; Bornestaf et Borg, 2000). Puisque sa reproduction est relativement bien maîtrisée en laboratoire, cette espèce peut être étudiée à chaque stade de son cycle de vie, notamment au stade larvaire qui est la période de vie la plus sensible (Hahlbeck et al., 2004a, 2004b). Un autre avantage est que le génome de l'épinoche à trois-épines a été séquencé et que pour l'épinoche mâle des marqueurs spécifiques aux sexes ont été développés (Griffiths et al., 2000, Peichel et al., 2004).

L'épinoche à trois épines a été auparavant utilisé comme organisme modèle pour l'évaluation des réponses biochimiques à divers xénobiotiques tels que les composés organoétains (Holm et al., 1991), les composés organo-halogéniques (Holm et al., 1993, 1994), les métaux (Sanchez et al., 2005; Roussel et al., 2007), les pesticides (Sturm et al., 1999, 2000, Wogram et al., 2001, Sanchez et al., 2006) ou les estrogènes et les androgènes environnementaux (Katsiadaki et al., 2002, Pottinger et al., 2002, Andersson et al., 2007; Bjorkblom et al., 2007; Petersson et al., 2007; Sebire et al., 2007). Plus récemment, l'épinoche a été décrite comme une espèce de poissons pertinente pour évaluer les stress sublétaux dans des contextes de multipollution (Sanchez et al., 2007, 2008b, 2008c).

Les aspects comportementaux liés ou non à la reproduction ont aussi été évalués dans des études écotoxicologiques chez l'épinoche à trois-épines. Des expositions à des concentrations environnementales réalistes d'EE₂ abaissent significativement l'agressivité des mâles lors de la cour (Bell, 2001). Également des épinoches mâles qui ont subi une

injection d' E_2 montrent un retard dans la construction du nid et une réduction des soins parentaux (Wibe et al., 2002b). D'autres études ont montré que des expositions à l' EE_2 rendent les épinoches plus vulnérables face à la prédation (Wibe et al., 2001; Bell, 2004). Des expositions à 0.1 mg/L de BBP altéreraient l'activité comportementale sur le fond des épinoches (Wibe et al., 2002a).

Puis récemment, l'importance de l'épinoche a augmenté fortement puisque plusieurs auteurs (Handy et al., 2002; Katsiadaki et al. 2002; Halbeck et al. 2004) l'ont montrée comme étant un très bon modèle biologique pour les études sur les perturbations endocriniennes. Effectivement en ayant un critère d'évaluation androgénique quantifiable, l'épinoche a maintenant été adoptée comme une espèce indicatrice sensible pour l'identification à la fois des contaminants antiandrogéniques et androgéniques. De ce fait, l'épinoche est actuellement la première espèce de poissons où des marqueurs biochimiques à la fois pour des effets environnementaux androgéniques et œstrogéniques peuvent être employés (Katsiadaki et al., 2002), puisqu'un test a été développé pour mesurer la VTG et la SPG dans un même individu (Hahlbeck et al.; Katsiadaki et al., 2002b, 2006).

CHAPITRE 3 : OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Ce mémoire s'inscrit intégralement dans la continuité d'un projet plus global, initié en 2002 par le Ministère des Pêches et Océans (MPO). Plus précisément, l'ARLA de Santé Canada a demandé au MPO de fournir des conseils scientifiques afin de réguler les impacts des pesticides sur les poissons et leurs habitats ainsi que sur les écosystèmes marins. De ce fait, cette étude constitue donc une recherche complémentaire quant à la caractérisation des effets des herbicides présents dans le Saint-Laurent sur la reproduction de populations d'espèces résidentes.

3.1. Objectif principal

L'objectif principal de cette étude est de **déterminer le seuil de toxicité relatif à chaque pesticide testé, présentant un risque que l'on extrapolera à l'ensemble des organismes marins de l'estuaire du Saint-Laurent.**

3.2. Objectif spécifique

Il s'agit **d'évaluer les effets d'expositions chroniques des deux herbicides sur des larves d'épinoches à trois-épines (*Gasterosteus aculeatus*)**. Les critères d'évaluation de la toxicité portent sur:

- la survie et le développement (croissance) des larves d'épinoches.

- les indicateurs de reproduction tels que les productions de vitellogénine et de spiggin des larves d'épinoches.
- la présence ou l'absence d'intersexe chez les larves d'épinoches dans les différents traitements de chaque bioessai.

3.3. Hypothèses principales

- Les expositions à 0.05 µg/L d'EE₂ induisent la production de VTG chez les larves.
- Les expositions à 3 µg/L de dihydrotestostérone induisent la production de SPG chez les larves.
- Les expositions d'atrazine induisent la production de VTG chez les larves.
- Les expositions d'atrazine induisent la production de SPG chez les larves.
- Les expositions de glyphosate induisent la production de VTG chez les larves.
- Les expositions de glyphosate induisent la production de SPG chez les larves.

Pour valider ces hypothèses, deux bioessais d'une durée de 42 jours ont été effectués, impliquant des expositions à différentes concentrations d'atrazine et de glyphosate (0.1, 1, 10 et 100 µg/L) sur des larves d'épinoches produites en laboratoire.

CHAPITRE 4

Effects of chronic exposures to the herbicides atrazine and glyphosate to larvae of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*).

Charline Le Mer ¹, Robert L. Roy ^{2*}, Jocelyne Pellerin ¹ and Domynick Maltais ²

¹ ISMER, Université du Québec à Rimouski, 300 Allée des Ursulines, P.O. Box 3300, Rimouski, Quebec, Canada G5L 3A1

² Department of Fisheries and Oceans, Maurice Lamontagne Institute, P.O. Box 1000, 850 route de la mer, Mont-Joli, Quebec, Canada G5H 3Z4

* to whom correspondence should be addressed (robert.roy@dfo-mpo.gc.ca)

Key words : *Gasterosteus aculeatus*, larval bioassay, atrazine, glyphosate, vitellogenin, spiggin, ELISA

Abstract

Atrazine and glyphosate are among the most widely used herbicides in Canada, yet there is relatively little information concerning their toxicity to early life stages of marine fish. We selected the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as a sentinel species for the Saint-Lawrence Estuary, since it reproduces in sensitive coastal habitats which receive effluents, runoff of pesticides during the summer, the peak season of herbicide use. In addition, sticklebacks have biomarkers for effects of both estrogenic (vitellogenin, VTG) and androgenic (the male nest-protein spiggin, SPG) contaminants. Stickleback adults from a clean reference site were allowed to reproduce in the laboratory and the fertilized eggs were incubated until hatching. Larval sticklebacks (<24 h old) were exposed for 42 days to four concentrations (0.1, 1, 10 and 100 µg/L) of either atrazine (ATR) or glyphosate (GLY), a seawater control, a carrier (acetone) control and two positive controls for estrogenic (0.05 µg/L ethinylestradiol, EE2) and androgenic (3 µg/L dihydrotestosterone, DHT) effects. The survivors were measured (length, wet weight) then conserved for analyses of VTG and SPG. There were no significant effects of ATR and GLY exposures on larval survival or growth, yet growth was lower at 1, 10 and 100 µg ATR /L and showed a slight dose-response. Exposure to 3 µg/L DHT resulted in a significant effect on growth (body lengths) but did not induce SPG, possibly because of DHT degradation after the 24h solution renewal. VTG was induced after the EE2 exposure, yet neither ATR nor GLY induced production of VTG and SPG. We conclude that these herbicides do not show estrogenic or androgenic effects to early life stages of sticklebacks at environmentally realistic concentrations.

Introduction

Atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropyl-amino-1,3,5-triazine, CAS 1912-24-9) and glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine, CAS 1071-83-6) are the most widely used agricultural herbicides in North America (Solomon et al. 1996, Solomon et al. 2008). Elevated concentrations of atrazine have been detected upstream of the Saint-Lawrence Estuary (SLE), since the fluvial section of the Saint-Lawrence River receives inputs from Lake Ontario (Pham et al. 2000) and from tributary rivers (Poissant et al. 2008, Giroux 2002). Glyphosate has not been detected in the SLE, though it is the most commonly used herbicide in Canada, representing 11 % of total pesticide use (Tellier 2006).

Atrazine exposure has been associated with various effects on fish, including kidney damage in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Oulmi et al. 1995, Graymore et al. 2001), impaired swimming behaviour in zebrafish *Danio rerio* (Steinberg et al. 1995), red drum *Sciaenops ocellatus* (Alvarez and Fuiman 2005) and goldfish *Carassius auratus* (Saglio and Trijasse 1998), as well as reduced growth in Atlantic salmon *Salmo salar* (Nieves-Puigdoller et al. 2007) and red drum (McCarthy and Fuiman 2008). Reported effects on reproduction parameters include decreased plasma testosterone and 11-ketotestosterone in male goldfish *Carassius auratus* (Spano et al. 2004) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L., Moore and Waring 1998). In zebrafish, Suzawa and Ingram (2008) reported that exposure to environmentally relevant atrazine concentrations increased the expression of Cyp19A1

gene, which encodes aromatase, the enzyme responsible for transforming testosterone to estradiol, and increased the ratio of females to males.

Glyphosate is considered of relatively low toxicity to aquatic organisms (Solomon and Thompson 2003, Geisy et al. 2000), yet there is little information on effects to marine organisms. In fish, sub-lethal exposures appear to induce liver histological alterations in carp *Cyprinus carpio* (Neskovic et al. 1996, Szarek et al. 2000) and the neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Langiano and Martinez 2008), to affect metabolism in piava *Leporinus obtusidens* and *Rhamdia quelen* (Gluszczak et al. 2006, Gluszczak et al. 2007), and to damage erythrocytes in goldfish (Çavaş and Könen 2007).

In female fish, increasing levels of 17 β -estradiol during the reproductive cycle induce the production of the egg yolk protein precursor, vitellogenin (VTG). Elevated levels of VTG are not normally present in male or juvenile fish but can be induced by exposure to xenoestrogens. The presence of elevated plasma VTG in male or juvenile fish is thus widely accepted as a biomarker of exposure to estrogenic substances (Sumpter and Jobling 1995, Tyler et al. 1996, Jobling et al. 1998, Denslow et al. 1999). During the breeding season, the kidneys of male sticklebacks secrete a nest-building protein, spiggin (SPG), in response to elevated levels of the androgen 11-ketotestosterone (Jakobsson et al. 1999). Female sticklebacks do not normally produce SPG, yet it has been demonstrated that their kidneys will produce the protein following exposure to androgens (Katsiadaki et al. 2002a, Hahlbeck et al. 2004a, Hahlbeck et al. 2004b). Immunoassays to measure stickleback VTG

and SPG have been developed (Katsiadaki et al. 2002a, Katsiadaki et al. 2004, Sanchez et al. 2008); three-spined sticklebacks are thus one of the few fish species with biochemical endpoints for both (anti-) androgens and (anti-) oestrogens (Katsiadaki et al. 2002b).

The three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) is widely distributed in coastal zones of the Northern hemisphere (Wootton 1984). In the Saint-Lawrence Estuary (Quebec, Canada), sticklebacks congregate in marsh areas during the summer breeding season, coinciding with the peak period of herbicide use, and these habitats often receive runoff from adjacent agricultural lands (Poulin and FitzGerald 1989).

The aim of this study was thus to determine the effect of exposures to the common herbicides atrazine and glyphosate to larval sticklebacks, using growth, survival and the reproductive biomarkers VTG and SPG as endpoints. We also investigated the responses of these endpoints in fish exposed to 17 α -ethynylestradiol (EE2) and dihydrotestosterone (DHT) as positive controls for estrogenic and androgenic effects.

Methods

Animals and maintenance

Stock population. In May 2007, adult three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, were collected from an uncontaminated site on the Gaspé Peninsula (Rivière Saint-Jean,

Quebec, Canada) by minnow cages. The fish were transported to the Institut Maurice-Lamontagne (IML, Mont-Joli, Quebec, Canada), where mature adult males and females displaying secondary sexual characters were separated and placed in 105 L tanks funded with a constant flow of filtered seawater. Animals were gradually acclimated over a 10-d period to a temperature of 18 ± 1 °C and salinity 15 ± 1 ‰, with a 16L : 8D photoperiod. Fish were fed twice a day with live or frozen adult *Artemia* (*Artemia* sp) and with a mixture of commercial fish pellets (Nutrafin TM, Rolf C. Hagen Inc, Montreal, QC, Canada) at approximately 2% body weight per day.

Reproduction. After 10 d of acclimation, 40 males and females were placed in 45 L glass tanks containing sand and filamentous algae as nest-building material. After mating, fertilised egg clutches from 5 females were removed from the nest and transferred to 1 L beakers, with aerated IML seawater water (18-19 °C) until hatching.

Chemicals

Glyphosate (purity ≥ 96 %) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Atrazine (purity ≥ 97.5 %) was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). DHT (purity ≥ 99 %) and EE2 (purity ≥ 98 %) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and acetone (pesticide grade) from Fisher (Montreal, QC, Canada). Anti-spiggin antibody and stickleback spiggin protein were generous gifts from Biosense Laboratories

AS (Bergen, Norway) and Dr. Wilfried Sanchez (Institut National de l'environnement industriel et des risques, Verneuil-en-halatte, France) respectively.

All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless mentioned otherwise.

Chronic laboratory exposures

Bioassays with larval sticklebacks were adapted from the protocol of Hahlbeck et al. (2004a, 2004b). Toxicity tests were conducted on two herbicides: atrazine and glyphosate, at 20 °C with a photoperiod of 16L : 8 D. Herbicide concentrations were chosen to be representative of environmental concentrations encountered in the SLE (0.1, 1 and 10 µg/l) and included a higher pharmacological concentration (100 µg/l) (Fig 1).

Exposures began at hatching of larvae (7 days after fertilization). Newly hatched larvae in good condition were selected and exposed to different treatments in 1 l glass beakers in 500 ml seawater supplied with aeration at 18 °C. Larvae were exposed to 4 nominal concentrations (0.1, 1.0, 10 and 100 µg/l) of each herbicide, to a seawater control, to an acetone (5 µg/L) carrier control and to positive controls, EE2 (0.05 µg/L) and DHT (3 µg/L). Each treatment was replicated 3 times and contained between 11-13 (ATR) and 9-10 fish (GLY), for totals of 36 animals per treatment for ATR and 30 animals for GLY. Larvae were fed once a day with *Artemia* nauplii. Dissolved oxygen, temperature and fish

mortality, determined by cessation of opercular movement, were monitored daily in all exposures. Water was changed every day (> 80 % replacement rate) before feeding. Animals were exposed throughout their embryo-larvae and juvenile life stages (from hatching to 42 dph) until the juveniles had a mean length of ~ 20 mm.

Experiments were conducted during summer 2007 and repeated during summer 2008. In 2007, there was an interval of 13-d between the ATR and GLY experiments. Each herbicide had separate seawater and positive (EE2 and DHT) controls. In 2008, ATR and GLY exposures were conducted concurrently, using the same control solutions.

Preparation of exposure solutions

Mother solutions of each pesticide were prepared by dissolving herbicides in deionised water to create four nominal stock concentrations in the range of 0.02 to 20 mg/L. However, due to the low solubility of atrazine in seawater (M. Lebeuf, IML, personal communication), this compound was first dissolved in acetone and added to dilute the experimental tank water with a maximal solvent final concentration of 0.0005 %. Glyphosate was dissolved directly in deionised water. The exposure solutions were prepared in 20L bottles by appropriate dilutions of stock solution and stored in the dark at 4 °C. One 20 L batch was used to renew experimental solutions for 14 d. EE2 and DHT solutions were prepared every day.

In 2007 and 2008, representative samples of stock and exposure of atrazine were collected over the course of the experiment. ATR samples were analyzed by GC–MS–MS at a Fisheries and Ocean laboratory (Freshwater Institute, Winnipeg, MB, Canada).

Prior to analyses, ATR samples were subjected to solid-phase extraction (SPE) according to a U.S. EPA procedure (USEPA, 2004). SPE cartridges (Bakerbond SPE TM columns, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) were preconditioned with 10 ml of acetone, 5 ml of methanol and 5 ml of distilled water. A 100 ml volume of filtered (5 µm Nytex mesh) exposure solution was passed through the cartridge at a flow rate of 5 ml/min. The cartridges were washed with 5 ml of distilled water and allowed to dry under vacuum for 15 min, then successively eluted with 3 ml of ethylether, 3 ml dichloromethane and 3 ml of 1:1 ethylether/ dichloromethane. Methylbuthylethane (5 ml) was added to the eluates prior to evaporation under of nitrogen.

Atrazine levels were also measured by commercial ELISA kits (Abraxis LLC, Warminster, PA, USA) and the detection limit was 0.04 ng/l.

Representative GLY samples were only collected in 2008 experiment. Analyses of GLY were conducted by the Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (Ministère de l'environnement et développement durable du Québec, Québec, QC, Canada) by liquid chromatography, post-column derivation and fluorescence detection, with a detection limit of 0.04µg/l.

Samples for analyses of EE2 and DHT were collected every day. Three ml volumes from each exposure replicate were pooled and filtered through 0.45 µm filters. The filtrate was collected frozen at -80 °C until analysed with specific immunoassays (EE2: Japan EnviroChemicals Ltd, Tokyo, Japan; DHT: dbc Inc., London, ON, Canada). Detection limits were 0.05 µg EE2/l and 6.0 pg DHT/l.

Growth measurements and reproductive endpoints

On day 42, all larvae were sampled and anaesthetised by immersion in MS-222 (0.1 g/l, ethyl 3-aminobenzoate methane sulfonate salt). Lengths (to nearest 0.05 mm) and weights (to nearest 0.01 mg) were measured. Half of the individuals, selected randomly from each treatment, were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for analyses of VTG and SPG.

Purification and characterization of VTG

For purification of VTG, plasma was collected from mature female sticklebacks (n = 45-60) and pooled. Fish were anaesthetised in MS-222 (10 mg/l), given a peritoneal injection of the proteolysis inhibitor aprotinin (6 µl of a 3 mM solution in 0.4 M Tris; Covens et al. 1988), and allowed to recover. After ~60 min, the same individual was anaesthetised, weighed and measured. Blood was collected by caudal severance into heparinised

haematocrit tubes and centrifuged (10 min at 3000 g) at 4° C. The plasma was recuperated and frozen at -80° C.

VTG was precipitated from plasma with MgCl₂ - EDTA (Norberg 1995). The precipitate was re-suspended in Tris/HCl buffer (50 mM, pH 8.0) and further purified by gel filtration. The column was eluted with buffer (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, pH 8.0) and fractions corresponding to VTG were pooled and concentrated by ultrafiltration (Ultrafree centrifugal membrane, 100 000 kDa porosity). The presumptive VTG was subjected to Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Native-PAGE, 3-8% tris-acetate gel) with precipitated plasma from females, MW standards (thyroglobulin, ferritin, catalase, lactate dehydrogenase) and purified smooth flounder (*Pleuronectes putnami*) VTG. The gel was stained with Coomassie blue. The same samples were run on Native-PAGE and stained with methyl green, Sudan black B and periodic acid/Schiff (PAS) reagent.

Purification of stickleback VTG was performed at 4° C with buffers containing the protease-inhibitor aprotinin (0.04 TIU/ml) to reduce degradation of VTG. VTG was isolated by anion exchange and gel filtration chromatography with a Pharmacia AKTA Fast Protein Liquid Chromatography system (Amersham Biosciences Inc., Montreal, QC, Canada).

Stickleback-VTG competitive ELISA

The VTG-ELISA is an indirect antigen competitive assay. Whole-body homogenates (WBH) from stickleback juveniles were prepared as described by Hahlbeck et al. (2004b), except that aprotinin (5 IU/ml) was added to the extraction buffer to reduce proteolysis.

Coating. Ninety-six-well microtiter plates (Nunc™, Mississauga, ON, CA) were coated with 100 µl per well of purified stickleback VTG (stb-VTG) solution (125 ng/ml) in 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer (adjusted to pH 9.6 with NaOH). Sealed plates were incubated for 1 h at room temperature, then overnight at 4°C. Coated plates were washed three times with washing buffer (PBS, 0.012 % Tween 20, pH 7.4) prior to the addition of 200 µl of blocking diluting buffer (PBS, 1% BSA, pH 7.4) and incubated at 20 °C for 2h. After another wash, plates were either used fresh or stored at -20 °C.

Primary antibody incubation. Standard curves were prepared by dilution of stb-VTG with blocking diluting buffer at a concentration of 1 µg/ml. Standards were prepared by serially diluted antigen by a factor of two to 1.95 ng/l. WBH samples were also diluted 1:2 in blocking buffer. Following this, 50 µl of standard solutions of purified stb-VTG and whole-body homogenate dilutions were added to the wells. The standards were dispensed in triplicates and all the samples in duplicates. Rabbit anti-stickleback VTG antibody (Biosense Laboratories AS, Bergen, Norway) were diluted 1:500 in blocking buffer and 50 µl of primary antibody solution were added to every wells except the non-specific binding

(NSB) wells. For the maximum binding wells, 50 µl of blocking buffer were added in three wells. The plates were covered with a lid and incubated for 90 min at room temperature under shaking and subsequently at 4°C overnight.

Secondary antibody incubation. The secondary antibody (rabbit-anti-rabbit IgG whole molecule peroxidase conjugate) was diluted 1:2000 in blocking buffer. Plates were washed three times with washing buffer and 100 µl of the diluted secondary antibody were then added to each well. Incubation was performed for 2h under shaking at 20 °C.

Absorbance. Wells were washed and each well received 100 µl of tetramethyl benzidine enzyme substrate (KPL, Gaithersburg, MD, USA). Plates were incubated 45 min in the dark at room temperature on a rotative plate. After addition of stop solution (100 µl of 1 M sulphuric acid, H₂SO₄) absorbance was read at 450 nm in a microtiter plate reader.

Stickleback-spiggin competitive ELISA

The competitive ELISA technique was performed as previously described (Sanchez et al. 2008b), using an antibody against a synthetic peptide specific to a spiggin sequence and spiggin standard made with hypertrophied kidneys from male sticklebacks exposed to androgenic substances. Briefly, stickleback spiggin was serially diluted to obtain standard concentrations between 100 to 0.2 U/ml. Standards and samples were incubated for 30 mn at 25 °C under shaking with the primary antibody (1:20 000 final dilution) and then

overnight at 4 °C. Standards and samples in duplicates with antibody (100 µl) were added to 96-wells microtiter plates previously coated with spiggin standard (5 U/ml in 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer) and incubated 2h at room temperature. The plates were washed and a 1: 3 000 dilution of anti-rabbit peroxidase-conjugated secondary antibody was added and incubated for 2h at 37 °C. Levels of spiggin samples were measured calorimetrically with the substrate tetramethyl benzidine (TMB) at 450 nm using a microtiter plate reader.

Statistical analyses

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean. All variables were tested for normality and homogeneity of variance by Shapiro-Wilk's test and square root, logarithmic, or arcsine transformations were applied when necessary. Differences among treatments were tested using analysis of variance (one way ANOVA) using SAS 9.1 (Version 2007 and 2008) with an $\alpha = 0.05$ level of significance. In 2007, responses in seawater control and EE2 solutions were compared by t-test.

Results

Treatment concentrations

Measured concentrations of ATR and EE2 in exposure solutions were reasonably close (≥ 80 %) to nominal values (Tables 1 and 2). In 2008, mean GLY concentrations (\pm S.E.M.)

were 0.08, 1.0 (± 0.6), 8 (± 1) and 78 (± 7) $\mu\text{g/l}$, reasonably close to the nominal values of 0.1, 1.0, 10 and 100 $\mu\text{g/l}$. Levels of DHT in fresh solutions were only $\sim 50\%$ of nominal (3.0 vs 1.5 $\mu\text{g/l}$, Table 2) and after 24h were $< 10\%$ of the nominal value (mean of 0.20 $\mu\text{g/l}$, Table 2). Levels of pesticides in the control seawater and acetone solutions were below detection limits.

Survival and growth endpoints

There was little mortality ($< 11\%$) in the ATR and GLY exposures over the 42-d experiments.

In 2007, separate seawater and positive controls were run for each herbicide series. There were no significant differences in growth of juveniles (wet weights, lengths) after 42-d in the separate controls ($p < 0.05$) so the data for each set was pooled. Within each year, growth of juveniles was similar in the ATR and GLY exposures compared to the appropriate controls (acetone carrier and seawater, respectively).

However there was a significant difference in the experimental individuals used in 2007 compared with 2008, despite the fact that the fish came from the same field site. At the end of the experiment in 2008, the juveniles were much smaller (up to 12 % less in body length) and weighed less (up to 32% in wet weight) compared to the animals at the end of the experiment in 2007 (compare Figs 2 and 3).

In the 2007 experiment, mean wet weight of DHT exposed larvae was significantly higher ($p < 0.05$) than the larvae exposed to ATR concentrations (1, 10 and 100 $\mu\text{g/l}$) and than larvae in the seawater control (Fig. 2). A similar pattern was observed in 2008, where growth of the DHT exposed larvae was significantly different than larvae exposed to EE2 or 100 $\mu\text{g GLY/l}$ ($p < 0.05$, Fig. 3). However, these differences are minor (only $\sim 4\%$, compared to 32%), when compared to the difference in growth between the 2007 and 2008 fish.

VTG and SPG

The sensibility of the ELISA was defined as the lowest detectable concentration of purified stickleback VTG. The standard curve was optimised to range from 30 to 2000 ng/ml and the detection limit for VTG in whole-body homogenate samples was ~ 15 ng/ml.

There was a significant induction of VTG in EE2-exposed larvae compared to the other treatments ($p < 0.05$, Fig. 4). Whole body VTG in juveniles exposed to 0.05 $\mu\text{g EE2/l}$ caused a significant induction of VTG ranging from 30 ng/mg to 3.5 $\mu\text{g/mg}$ of fish (Fig. 4), yet no induction of VTG was observed in larvae exposed to either herbicide. As expected, the levels of VTG in larvae exposed to DHT and the two negative controls (seawater and carrier) were under the detection limit of the assay.

No induction of spiggin was observed in all treatments even in larvae exposed to the positive DHT control. As discussed below, DHT may not be the best positive control for these types of bioassays.

Discussion

We exposed larval sticklebacks to ATR and GLY for 42-d in experiments run in 2007 and 2008. The little mortality observed may have been due to natural causes or, despite careful manipulations, to accidental injury during solution replacement. Neither herbicide exposure caused significant effects on survival or growth of the larvae, at concentrations ranging from 0.1-100 µg/l. Our results for GLY are consistent with those of similar studies (Mitchell and Chapman 1987, Morgan and Kiceniuk 1992, Huang et al. 2005).

Although not statistically different than the controls, we did observe a minor tendency to lower growth in larvae exposed to ATR concentrations of 1, 10 and 100 µg/l. Other researchers have reported significant reductions in growth after exposure of fish to ATR. Alvarez and Fuiman (2005) reported that environmentally realistic doses of ATR reduced the growth rates of red drum larval growth rate by 8-10 %. Nieves-Puigdoller et al. (2007) found reduced growth rates of Atlantic salmon juveniles after an exposure of 21d at 100 µg ATR/l.

As noted above, there were significant differences in the lengths and weights of juveniles in the 2007 and 2008 experiments. The differences in wet weights for the 2007 and 2008 experiments of our study, ranging between 22 - 37%, were roughly comparable to the variability of 18-23% in growth results for 7-d tests with laboratory cultured fathead minnows (DeGraeve et al. 1991). Our fish were wild animals obtained from the Rivière Saint-Jean, a protected salmon river that is a relatively pristine site far from any anthropogenic influence. However, field-collected populations are probably more variable than laboratory cultured animals such as fathead minnows. Knowing the variability inherent in field populations, we repeated these experiments in successive years.

With the exception of DHT, measured concentrations were maintained at $\geq 80\%$ of nominal concentrations. Measured concentrations of DHT in freshly prepared solutions were $\sim 50\%$ of and decreased to $< 20\%$ of the nominal value of $3.0\ \mu\text{g/l}$ after 24-h. We did not observe any induction of SPG in juveniles exposed to DHT. The actual exposure level of DHT was probably not sufficient to induce the production of spiggin in the positive control. However, the nominal concentration we here selected, $3\ \mu\text{g DHT/l}$, has been shown to induce SPG in adult sticklebacks (Katsiadaki et al. 2002a).

The differences between the measured and nominal concentrations of DHT in the freshly prepared exposure solutions may be due to absorption of DHT to the glassware. Androgens, such as DHT, are poorly soluble in aqueous solutions (Fostier et al 1993). However, our exposure solutions with ATR, EE2 and DHT included acetone as a solvent-

carrier, at a concentration of 0.0005 %. Hahlbeck et al. (2004a, 2004b) used a higher concentration of acetone, 0.0025%, as carrier. However, we observed significant intersex in juvenile sticklebacks at this acetone concentration (R. Roy, unpublished data), so we decreased the concentration of acetone in these experiments. Yet the 0.0005 % acetone concentration may not have been sufficient to completely solubilise DHT.

We also observed a significant loss of DHT in exposure vessels after 24-h, possible due to degradation. Panter et al. (2004) observed significant losses of DHT (8 and 60 % of nominal) in their exposures with fathead minnows (*Pimephales promelas*) and attributed the losses to biodegradation. Similarly, Katsiadaki et al. (2002a) observed losses of DHT in semi-static exposures with adult sticklebacks and suggested that this model androgen is unstable in aqueous solutions (Katsiadaki et al. 2006). We used a similar semi-static design as described by Hahlbeck et al. (2004a, 2004b) and Katsiadaki et al. (2002a). However, we replaced the solutions more frequently ($\geq 80\%$ renewal every 24-h), approximating the minimum conditions for a flow-through design.

Methyltestosterone (MHT) has been used as a positive androgenic control substance in other studies of endocrine disruption (Katsiadaki et al. 2002a, Katsiadaki et al. 2006, Hahlbeck et al. 2004a). However, MHT may also be degraded in exposure solutions, especially in semi-static or static exposures. Hahlbeck et al. (2004a) noted that levels of MHT in exposure vessels of larval sticklebacks were non-detectable after 48 h. In addition, unlike DHT, elevated concentrations of MHT may also have estrogenic properties, as the

compound can be aromatized to produce estradiol (Hahlbeck et al. 2004a). This estrogenic pathway complicates interpretation of results of MHT exposures and thus Hahlbeck et al. (2004b) suggested DHT as a suitable androgenic control for the stickleback larval assay. However, the results of this study suggest that DHT may not be an appropriate positive control for this assay.

In 2007, we observed a small but significant effect of DHT exposure on larval growth (body length, wet weight) compared to controls. A similar tendency to higher growth in DHT was observed in 2008, though the difference was not significant. Studies involving exposure to DHT exposures have shown different effects on growth in fish. Sehgal et al. (1995) fed carp a diet dosed with 200 mg DHT/kg for 30 days and found an enhanced growth rate. In contrast, Panter et al. (2004) found that DHT did not cause any effects on somatic growth of adult fathead minnow after an aqueous exposure lasting 21d. Piferrer and Donaldson (1991) administered MHT to newly hatched coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) but did not find any increase in growth at 130 days post hatch.

In this study, a 42-d exposure to 0.05 µg EE2/l had a definite estrogenic effect on juvenile three-spined sticklebacks, shown by elevated levels of whole-body VTG. Several researchers have observed induction of VTG when juvenile small fish are exposed to relatively low concentrations of EE2. Production of VTG in immature cyprinids and rainbow trout was induced by aqueous exposures to 10 ng EE2/l and 0.1 ng EE2/l, respectively (Purdom et al. 1994). In juvenile fathead minnow, VTG was induced at

concentrations of 2 ng/ml (Panter et al. 2002), 10 ng/l (Van Aerle et al. 2002) and 16 ng/l (Lange et al. 2001). Orn et al. (2003) reported a dose-dependent induction of VTG in 20-38 d post-hatch juvenile zebrafish at a nominal concentration of 2 ng EE2/l. A significant dose-dependent increase of total body VTG content was found for zebrafish larvae exposed to 10 and 25 ng EE2/l for 3 months post fertilization (Van den Belt et al. 2003). Andersen et al. (2003) reported whole body levels of 2.26 ± 1.49 mg VTG/g in zebrafish juveniles after exposure to 15.4 ng EE2/l from hatch to 30 dph.

In this study, a 42-d exposure to 0.05 µg EE2/l resulted in levels of whole-body VTG ranging from 30 to 3500 ng/mg. VTG was also induced in juvenile sticklebacks with exposure to 50 ng EE2/l (Hahlbeck et al. 2004b), the same EE2 concentration used in this study. It has been shown that VTG (and SPG) are good biomarkers for estrogenic (and androgenic) endocrine disruption in juvenile and adult sticklebacks (Katsiadaki et al. 2002b, Hahlbeck et al. 2004b). Andersson et al. (2007) reported a lowest observed effect concentration (LOEC) for induction of VTG of 53.7 ng EE2/l in adult male sticklebacks, while Hahlbeck (2004) reported that VTG was induced by EE2 at a nominal concentration as low as 4 ng/l. The results of this study suggest that the sensitivity of larvae / juvenile sticklebacks to EE2 more closely resembles that observed with adult males.

Neither ATR nor GLY induced production of VTG in larval sticklebacks after 42-d exposures. Our results suggest that ATR is not estrogenic to fish, as supported by *in vivo* and *in vitro* studies with hepatocytes of male carp (30 µM atrazine, Sanderson et al. 2001),

exposure studies involving mature goldfish (100 µg/l atrazine, Spano et al. 2004) and with mature fathead minnows (5 and 50 µg/l, Bringolf et al. 2004). Very little data are available on the reproduction effects of glyphosate. However, Xie et al. (2005) did not observe any induction of VTG in rainbow trout when exposed to GLY alone, as observed in our study.

Spiggin is the first biochemical marker for androgen-induced endocrine disruption in fish and induction of spiggin has been proposed as biomarker for anti-androgenic and androgenic substances (Katsiadaki et al. 2002a, Katsiadaki et al. 2002b, Hahlbeck et al. 2004b, Sanchez et al. 2008b). In this study, there was no induction of SPG in juvenile sticklebacks exposed to ATR or GLY for 42-d, and we conclude that it is unlikely that these compounds are androgenic.

Conclusion

We did not observe any induction of VTG or SPG in juvenile sticklebacks exposed for 42-d to environmentally realistic concentrations of atrazine and glyphosate. Our results indicate that these compounds are not estrogenic or androgenic.

Acknowledgements

B. Lagacé, H. Talbot, K. Bélair and V. Bélair provided technical assistance with bioassays and chemical sampling. V. Desbordes purified stickleback VTG. Dr W. Sanchez kindly

helped with analyses of SPG. This work was financially supported by a grant from the Pesticide Research Program of the Department of Fisheries and Oceans Canada.

References

- Alvarez MDC, Fuiman LA (2005) Environmental levels of atrazine and its degradation products impair survival skills and growth of red drum larvae. *Aquat Toxicol* 74: 229-241.
- Andersen L, Holbech H, Gessbo A, Norrgren L, Petersen GI (2003) Effects of exposure to 17 α -ethynylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol* 134C: 365-374.
- Andersson C, Katsiadaki I, Lundstedt-Enkel K, Orberg J (2007) Effects of 17 α -ethynylestradiol on EROD activity, spiggin and vitellogenin in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquat Toxicol* 83: 33-42.
- Bringolf RB, Belden JB, Summerfelt RC (2004) Effects of atrazine on fathead minnow in a short-term reproduction assay. *Environ Toxicol Chem* 23: 1019-1025.
- Çavas T, Könen S (2007) Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22: 263-268.
- Covens M, Stynen D, Ollevier F, De Loof A (1988) Concanavalin A reactivity of vitellogenin and yolk proteins of the threespined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (Teleostei). *Comp. Biochem Physiol* 90B: 227-233.
- del Carmen A.M., Fuiman LA (2005) Environmental levels of atrazine and its degradation products impair survival skills and growth of red drum larvae. *Aquat Toxicol* 74: 229-241.
- DeGraeve GM, Cooney JD, McIntyre DO, Pollock TL, Reichenbach NG, Dean JH, Marcus MD (1991) Variability in the performance of the seven-day fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: An intra- and interlaboratory study. *Environ Toxicol Chem* 10: 1189-1203.
- Denslow ND, Chow MC, Kroll KJ, Green L (1999) Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology* 8: 385-398.

- Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B, Zohar Y (1983). The Gonadal Steroids. Pp. 277-371 In: Fish Physiology. Vol 9. Reproduction. Part A. Endocrine Tissues And Hormones. (Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM, eds.). Academic Press, New York NY.
- Giesy JP, Dobson S, Solomon KR (2000) Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev Environ Toxicol* 167: 35-120.
- Giroux I. 2002. Contamination de l'eau par les pesticides dans les régions de culture de maïs et de soya au Québec, Campagnes d'échantillonnage de 1999, 2000 et 2001 et évolution temporelle de 1992 à 2001. Ministère de l'Environnement du Québec. Direction du suivi de l'état de l'environnement. 45 p.
- Gluszczak L, dos Santos Miron D, Crestani M, Braga da Fonseca M, de Araujo Pedron Fd, Duarte MF, Vieira VLP (2006) Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol Environ Saf* 65: 237-241.
- Gluszczak L, Miron DdS, Moraes BS, Simoes RR, Schetinger MRC, Morsch VM, Loro VL (2007) Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp Biochem Physiol* 146C: 519-524.
- Graymore M, Stagnitti F, Allinson G (2001) Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Env Intern* 26: 483-495.
- Hahlbeck E, Griffiths R, Bengtsson BE (2004a) The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption. I. Sexual differentiation. *Aquat Toxicol* 70: 287-310.
- Hahlbeck E, Katsiadaki I, Mayer I, Ildolfsson-Erici M, James J, Bengtsson BE (2004b) The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption II--kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction. *Aquat Toxicol* 70: 311-326.
- Hahlbeck E (2004) The juvenile three-spined stickleback – model organism for the study of estrogenic and androgenic endocrine disruption in laboratory and field. Thesis Stockholm University, Sweden.
- Huang X, Fong S, Deanovic L, Young TM (2005) Toxicity of herbicides in highway runoff. *Environ Toxicol Chem* 24: 2336-2340.
- Jakobsson S, Borg B, Haux C, Hyllnet SJ (1999) An 11-ketotestosterone induced kidney-secreted protein: the nest building glue from male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Fish Physiol Biochem* 20: 79-85.

- Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP (1998) Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ Sci Technol* 32: 2498-2506.
- Katsiadaki I, Scott AP, Hurst MR, Matthiessen P, Mayer I (2002a) Detection of environmental androgens: A novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environ Toxicol Chem* 21: 1946-1954.
- Katsiadaki I, Scott AP, Mayer I (2002b) The potential of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a combined biomarker for oestrogens and androgens in European waters. *Mar Environ Res* 54: 725-728
- Katsiadaki I, Morris S, Squires C, Hurst MR, James JD, Scott AP (2006) Use of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as a sensitive *in vivo* test for detection of environmental antiandrogens. *Environ Health Perspect* 114: 115-121.
- Lange R, Hutchinson TH, Croudace CP, Siegmund F, Schweinfurth H, Hampe P, Panter GH (2001) Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20: 1216-1227.
- Langiano VdC, Martinez CBR (2008) Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol* 147C: 222-231.
- McCarthy ID, Fuiman LA (2008) Growth and protein metabolism in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae exposed to environmental levels of atrazine and malathion. *Aquat Toxicol* 88: 220-229.
- Mitchell DG, Chapman PM, Long TJ (1987) Acute toxicity of “roundup” and “rodeo” herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. *Bull Environ Contamin Toxicol* 39: 1028-1035.
- Moore A, Waring CP (1998) Mechanistic effects of a triazine pesticide on reproductive endocrine function in mature Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Pest Biochem Physiol* 62: 41-50.
- Morgan MJ, Kiceniuk JW (1992) Response of rainbow trout to a two month exposure to “Vision”, a glyphosate herbicide. *Bull Environ Contamin Toxicol* 48: 772-780.
- Nieves-Puigdoller K, Bjornsson BT, McCormick SD (2007) Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in Atlantic salmon. *Aquat Toxicol* 84: 27-37.

- Orn S, Holbech H, Madsen TH, Norrgren L, Petersen GI (2003) Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquat Toxicol* 65: 397-411.
- Oulmi Y, Negele RD, Braunbeck T (1995) Segment specificity of the cytological response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) renal tubules following prolonged exposure to sublethal concentrations of atrazine. *Ecotox Environ Safety* 32: 39-50.
- Panter GH, Hutchinson TH, Lange R, Lye CM, Sumpter JP, Zerulla M, Tyler CR (2002) Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances. *Environ Toxicol Chem* 21:319-326.
- Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004) Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquat Toxicol* 70: 11-21.
- Pham TT, Rondeau B, Sabik H, Proulx S, Cossa D (2000) Lake Ontario: the predominant source of triazine herbicides in the St. Lawrence River. *Can J Fish Aquat Sci* 57:78-85.
- Piferrer F, Donaldson EM (1991) Dosage-dependent differences in the effect of aromatizable and nonaromatizable androgens on the resulting phenotype of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Physiol Biochem* 9: 145-150.
- Poissant L, Beauvais C, Lafrance P, DeBlois C (2008) Pesticides in fluvial wetlands catchments under intensive agricultural activities. *Sci Tot Environ* 404: 182-195.
- Poulin R, FitzGerald GJ (1989) Early life histories of three sympatric sticklebacks in a salt-marsh. *J Fish Biol* 34: 207-221.
- Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP (1994) Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 8: 275-285.
- Saglio P, Trijasse S (1998) Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Arch Environ Contamin Toxicol* 35: 484-491.
- Sanchez W, Goin C, Brion F, Olsson PE, Goksoyr A, Porcher JM (2008) A new ELISA for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin, using antibodies against synthetic peptide. *Comp Biochem Physiol* 147C: 129-137.
- Sanderson JT, Letcher RJ, Heneweer M, Giesy JP, van den Berg (2001) Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines

- and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environ Health Perspect* 109: 1027-1031.
- Sehgal GK, Saxena PK, Sehgal HS (1995) Hormonal control of sex in common carp and its application to composite fish culture. *Aquacul* 129: 215-219.
- Solomon KR, Baker DB, Richards RP, Dixon KR, Klaine SJ, La Point TW, Kendall RJ, Weisskopf CP, Giddings JM, Giesy JP, Hall J, Williams WM (1996) Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ Toxicol Chem* 15: 31-76.
- Solomon KR, Thompson DG (2003) Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *J Toxicol Environ Health* 6B: 289-324.
- Solomon KR, Carr JA, du Preez LH, Giesy JP, Kendall RJ, Smith EE, Van der Kraak GJ (2008) Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *Critical Reviews in Toxicology* 38: 721-772
- Spano L, Tyler CR, Van Aerle R, Devos P, Mandiki SN, Silvestre F, Thome JP, Kestemont P (2004) Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat Toxicol* 66: 369-379.
- Steinberg, CEW, Lorenz R, Spieser OH (1995) Effects of atrazine on swimming behaviour of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Wat Res* 29: 981-985.
- Sumpter JP (2001) Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1216-1227.
- Sumpter JP, Jobling S (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103: 173-178.
- Suzawa M, Ingraham HA (2008) The herbicide atrazine activates endocrine gene networks via non-steroidal NR5A nuclear receptors in fish and mammalian cells. *PLoS ONE* 3.
- Tellier S (2006) Les pesticides en milieu agricole : état de la situation environnementale et initiatives prometteuses. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, Direction des politiques en milieu terrestre, Service des pesticides. 90 p.
- Tyler CR, Van der Eerden B, Jobling S, Panter G, Sumpter JP (1996) Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. *J Comp Physiol* 166: 418-426.

- Van Aerle R, Pounds N, Hutchinson TH, Maddix S, Tyler CR (2002) Window of sensitivity for the estrogenic effects of ethinylestradiol in early life-stages of fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Ecotoxicology* 11: 423-434.
- Van Den Belt K, Verheyen R, Witters H (2003) Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotox Environ Saf* 56: 271-281.
- Wootton RJ (1976) The biology of the sticklebacks. Academic Press London 387 p.
- Xie L, Thrippleton K, Irwin MA, Siemering GS, Mekebri A, Crane D, Berry K, Schlenk D (2005) Evaluation of estrogenic activities of aquatic herbicides and surfactants using an rainbow trout vitellogenin assay. *Toxicol Sci* 87: 391-398.

Table 1. Measured concentrations ($\mu\text{g/L}$) of ATR, determined by ELISA, in fresh exposure solutions ($t = 0$) and the same solutions prior to renewal ($t = 24$) for experiments conducted in 2007 and 2008

	2007		2008	
	Measured			
Nominal	t = 0	t = 24	t = 0	t = 24
0.1	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.02
1	1.00 ± 0.06	0.99 ± 0.06	1.06 ± 0.06	1.00 ± 0.20
10	9.0 ± 0.3	9.2 ± 0.3	10.0 ± 0.1	12.3 ± 0.2
100	90 ± 7	89 ± 14	89 ± 5	113 ± 10

N = 7-8 for atrazine bioassay 2007

N = 3 for atrazine bioassay 2008

Table 2. Measured concentrations ($\mu\text{g/L}$) of EE2 and DHT, determined by ELISAs, in fresh exposure solutions ($t = 0$) and the same solutions prior to renewal ($t = 24$) for experiments conducted in 2007 and 2008

		2007		2008	
		Measured			
Treatment	Nominal	t = 0	t = 24	t = 0	t = 24
EE2	0.05	0.057 ± 0.007	0.053 ± 0.006	0.056 ± 0.007	0.037 ± 0.003
DHT	3.0	1.70 ± 0.26	0.56 ± 0.22	1.09 ± 0.22	0.19 ± 0.19

N = 9-17 for EE2 and DHT in 2007

N = 7-12 for EE2 and DHT in 2008

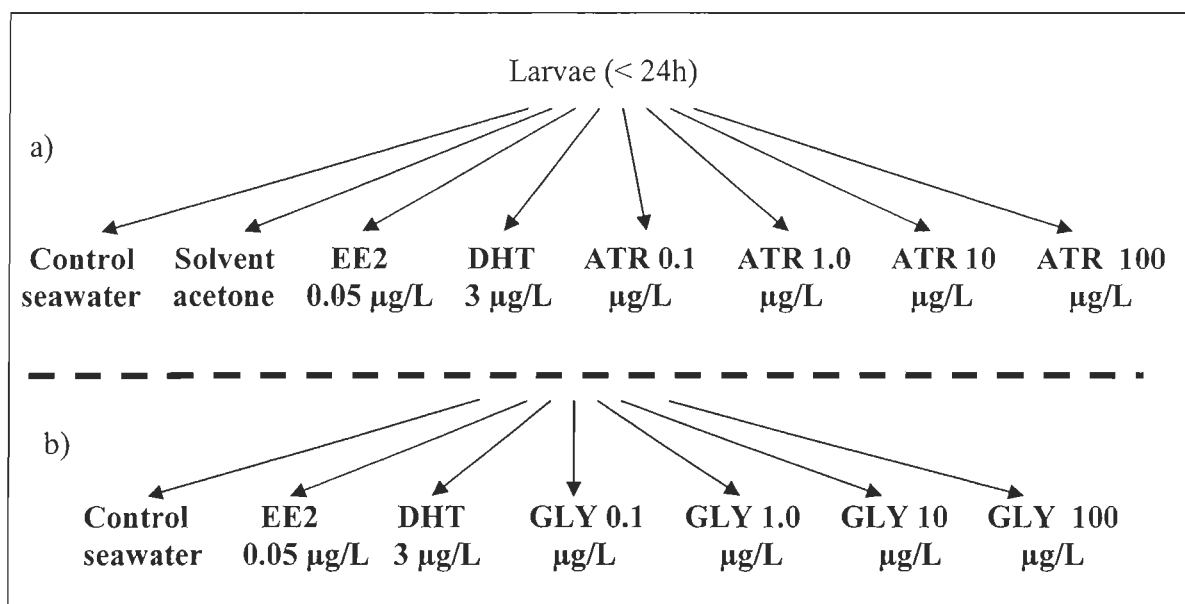


Figure 1 : Scheme of experimental design for a) atrazine bioassay and b) glyphosate bioassay in 2007.

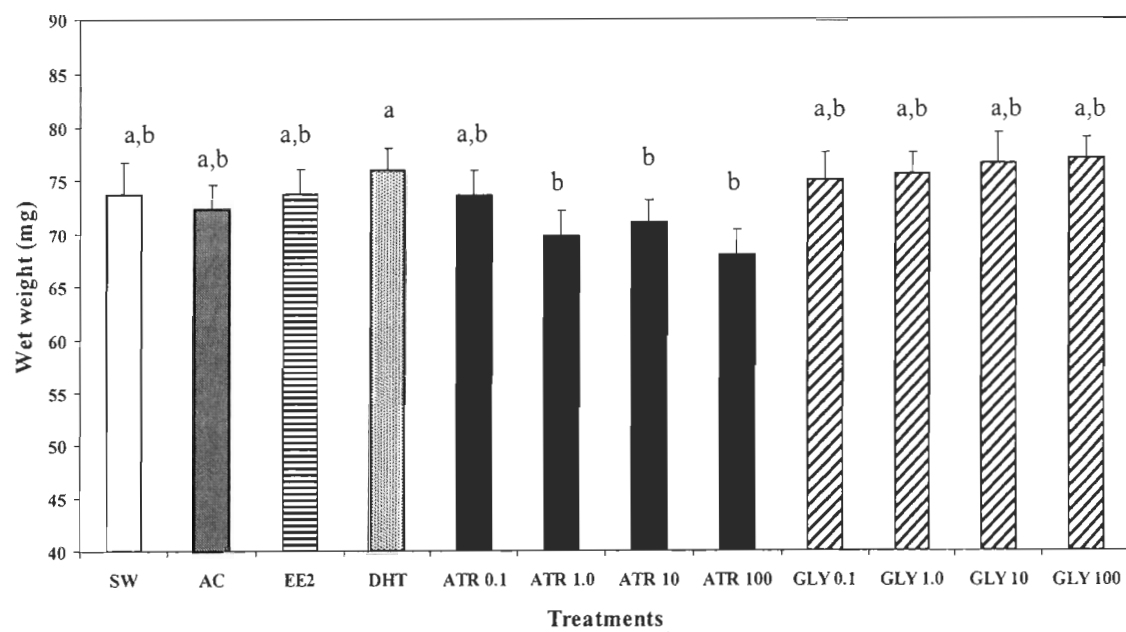


Figure 2. Wet weights (mean \pm S.E.M.) of juvenile three-spined sticklebacks after 42 days of exposure to concentrations of atrazine and glyphosate in 2007

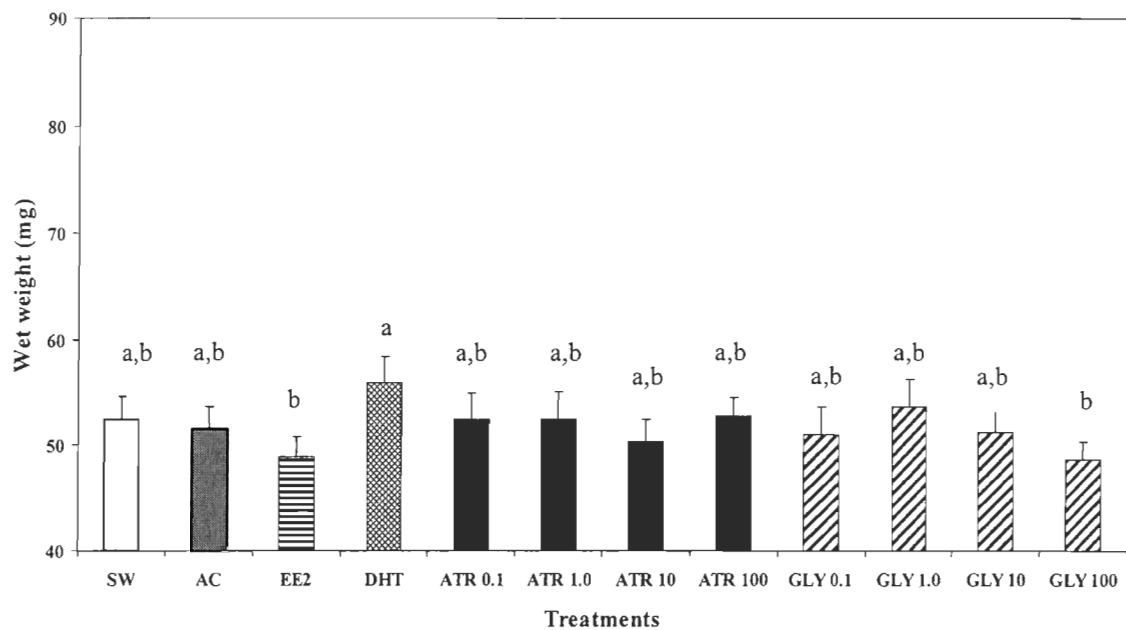


Figure 3. Wet weights (mean \pm S.E.M.) of juvenile three-spined sticklebacks after 42 days of exposure to concentrations of atrazine and glyphosate in 2008.

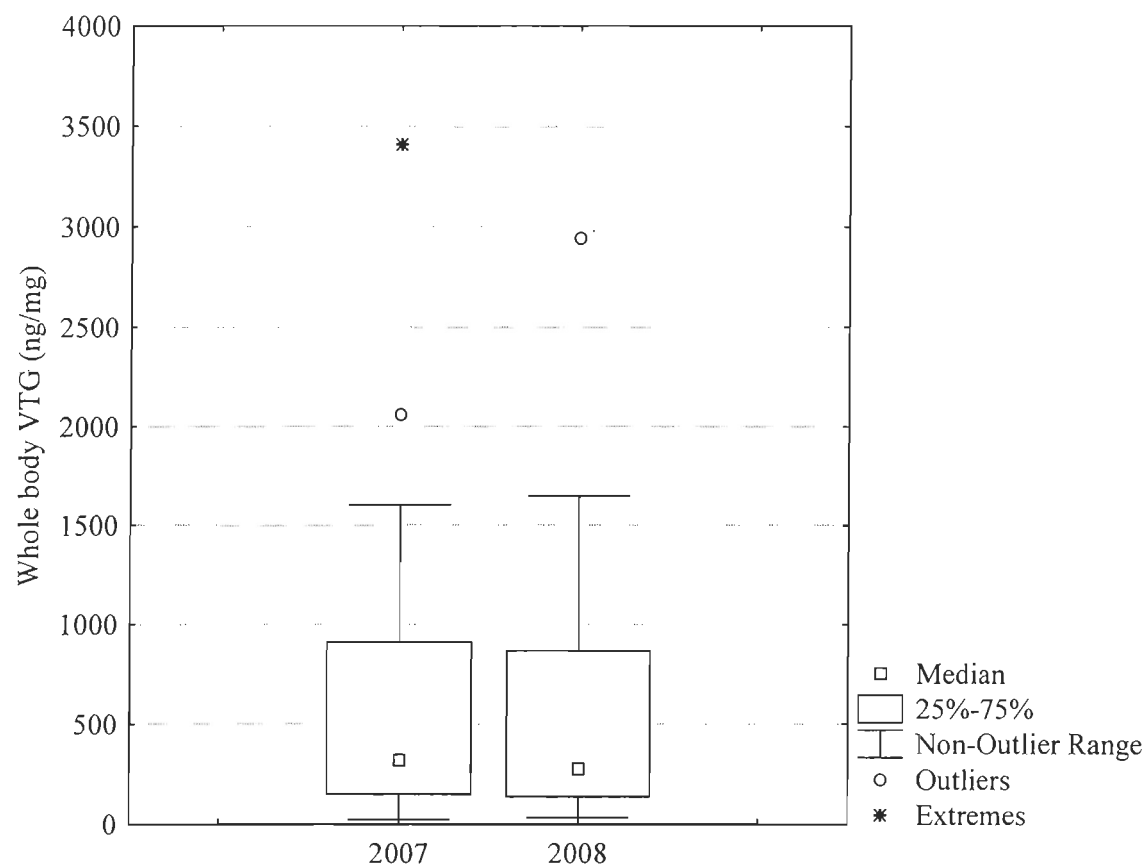


Figure 4. Whole body VTG levels (mean \pm 2 S.D., in $\mu\text{g/g}$) in juvenile three-spined sticklebacks after 42 days of exposure to EE2 in 2007 and 2008

CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Un des buts de ce mémoire était d'évaluer la pertinence de l'épinoche à trois-épines comme une espèce modèle pour le suivi des polluants environnementaux. Auparavant cette espèce avait été suggérée comme un bon candidat puisqu'elle possède des critères d'évaluation quantifiables pour les expositions aux androgènes/anti-androgènes (spiggin), estrogènes/ anti-estrogènes (vitellogénine) et aux substances agonistes AhR (aryl hydrocarbon receptor ; activité EROD). L'épinoche à trois-épines est actuellement sous investigation pour être incluse comme une espèce test dans le guide OCDE (Organisation de coopération et de développement économique). C'est une espèce euryhaline, robuste et facile à maintenir en laboratoire où sa reproduction peut être contrôlée par des manipulations de la photopériode et de la température. De plus, la petite taille de l'épinoche à trois-épines la rend appropriée pour des installations expérimentales en laboratoire et des études sur le terrain. Un autre avantage est que le génome de l'épinoche à trois-épines est séquencé et que des marqueurs d'ADN liés au sexe ont été identifiés (Griffiths et al., 2000; Peichel et al., 2004). C'est alors possible d'identifier le sexe génétique qui est un avantage significatif dans les études sur les contaminants affectant la reproduction des organismes. Bien que l'évaluation de l'épinoche comme espèce test par l'OCDE soit en cours, peu de données sont disponibles sur la sensibilité de l'épinoche aux estrogènes et aux androgènes.

Pour répondre à l'objectif principal de cette étude, à savoir si il y a un seuil de toxicité relatif à chaque pesticide testé qui présenterait un risque pour les organismes

marins résidants l'estuaire du Saint-Laurent, nous pouvons en conclure, que les herbicides atrazine et glyphosate en concentrations testés dans cette étude (0,1 – 100 µg/L) ne sembleraient pas être toxiques, tant pour la croissance que pour la reproduction, pour les espèces marines de l'estuaire du Saint-Laurent.

Le DHT : est-ce le meilleur choix comme contrôle positif pour les effets androgéniques?

Il est maintenant établi qu'il existe des composés dits androgéniques, capables d'induire des réponses typiquement mâles chez des organismes exposés à ces contaminants. Des travaux en laboratoire, avec des épinoches mâles ou femelles matures, gonadectomisés ou non, ont montré l'apparition de réponses androgéniques (caractères sexuels secondaires, production de spiggin, hypertrophie des reins) suite à des expositions dans l'eau à la 11-KT, au 17 α -MT ou au DHT en concentrations basses (Hoar, 1963 ; Katsiadaki et al., 2002a). Dans cette étude, nous avons choisi le DHT comme contrôle positif pour les effets androgéniques; d'une part puisque le composé 11-KT est moins facilement disponible et beaucoup plus cher que le 17 α -MT (Katsiadaki et al., 2002a). D'autre part, il apparaîtrait que le 17 α -MT ait aussi une activité œstrogénique à forte concentration (Mori et al., 1998; Ankley et al., 2001). À plusieurs reprises dans leurs études, Katsiadaki et al. (2002a, 2002b et 2006), ont choisi comme modèle androgène le DHT car ce dernier ne peut pas être aromatisé en 17 β -estradiol, contrairement à son analogue androgène le 17 α -MT. Cependant dans notre étude, nous n'avons pas ou très peu observé d'induction de spiggin dans les larves d'épinoches suite à une exposition de 5

semaines à 3 µg DHT/L. Or, Katsiadaki et al., (2002) ont exposé sur une période de 3 ou 5 semaines des épinoches femelles matures à des concentrations croissantes de DHT dans l'eau et ont démontré clairement des réponses en fonction de la dose dans la production de spiggin. La LOEC, concentration minimale à partir de laquelle un effet est observé, a été établi à 3 µg/L et à 2 µg/L pour le DHT après respectivement 3 et 5 semaines d'exposition (Katsiadaki et al., 2002a). Cette même étude a également montré qu'une dose de 5 µg DHT/L cause une induction significative de spiggin après une exposition de 7 et 14 jours ainsi qu'à une concentration de 1.5 µg DHT/L une épinuche femelle présente une induction de spiggin mais seulement après 35j d'exposition (Katsiadaki et al, 2002a). De plus, plusieurs auteurs ont discuté la puissance des androgènes (11-KT, T, DHT et 17α-MT). En effet, Borg et al. (1993) ont montré que le plus puissant androgène était la 11-KT puisque ce composé était 40 et 300 fois plus puissant que respectivement le DHT et la testostérone. De plus, De Ruiter et Mein (1982) ont montré que la 11-KT était plus puissante que le 17α-MT dans la stimulation in vitro des reins des épinoches. D'autres résultats ont indiqué que le 17α-MT (LOEC = 100 ng/L) est plus puissant que le DHT (LOEC = 3 µg/L) (Katsiadaki et al. 2002a). En moyenne, le composé 17α-MT induit 2.30×10^5 unités de spiggin/g de poids du corps à une concentration de 1 µg/l alors que le DHT était inefficace à 1 µg/l. À 10 µg/L, le 17α-MT induit aussi 2.80×10^5 unités alors que le DHT induit seulement 1.90×10^5 unités à 50 µg/l (Katsiadaki et al. 2002a). Une étude in vitro a montré que le DHT était plus sensible que la testostérone et la 11-KT dans l'induction de spiggin puisque la LOEC du DHT était de 10^{-12} M in vitro comparé à 10^{-10} M pour la LOEC de la testostérone et de la 11-KT (Jolly et al., 2006).

De plus, nous avons observé une baisse de la concentration nominale de DHT dans l'eau après 24h d'exposition avec les larves. Plusieurs études ont montré qu'il y avait une perte de DHT suite à une exposition dans l'eau, comme observé dans notre étude. En effet, Panter et al. (2004) ont exposé des tête-de-boule adultes au DHT en concentration nominale de 10, 32 et 100 µg/L et en réalité, les concentrations mesurées étaient respectivement de 6.0, 6.1 et 8.6 µg/L après analyses chimiques. De plus, Katsiadaki et al., (2002a) notaient également une perte de DHT dans l'eau des aquariums en condition expérimentale semi statique, par rapport aux concentrations nominales. Ces auteurs ont indiqué que le DHT a une faible stabilité dans l'eau due à sa biodégradation (Panter et al., 2004) et donc qu'il n'est pas approprié de l'utiliser dans des expositions semi statiques (Katsiadaki et al., 2002a). Par la suite, ils ont testé ce composé dans un système à débit continu et les résultats ont montré que les concentrations mesurées avoisinaient les concentrations nominales (Katsiadaki et al. 2006). Pour finir, ces mêmes auteurs ont conclu que le 17 α -MT induit une réponse androgénique plus forte (i.e. hypertrophie des reins) que le DHT quand ils sont utilisés tous les 2 aux mêmes concentrations que ce soit dans un système d'exposition à débit continu ou semi statique. Les auteurs de cet article ont donc proposé l'utilisation du DHT à 5 µg/L sous des conditions d'exposition de débit continu pour stimuler la production de spiggin chez les poissons femelles.

En conclusion et à la vue de toutes ces études ainsi que de nos résultats, le DHT était un bon choix de composé pour induire des effets masculinisants chez l'épinoche compte tenu des inconvénients (cités ci-dessus) de la 11-KT et du 17 α -MT. Cependant,

considérant la perte du DHT en milieu aqueux dans un système expérimental semi-statique et le modèle biologique de l'étude, la larve, il aurait été préférable d'augmenter la concentration du DHT afin de s'assurer d'avoir toujours une concentration suffisante après 24h d'exposition pour entraîner une production de spiggin même après la perte possible de DHT.

Justification de la concentration de l'EE₂ et induction de la vitellogénine

Dans cette étude, nous avons choisi l'EE₂ comme control positif pour les effets estrogéniques en concentration 0.05 µg/L. La VTG a d'ailleurs été très bien induite puisque des concentrations de VTG allant de 123 µg/g à 10.4 mg/g de poissons ont été mesurées dans les juvéniles après les 42j d'exposition à l'EE₂. Hahlbeck et al. (2004b) ont testé plusieurs concentrations d'E₂ et d'EE₂ susceptibles d'induire la production de VTG chez des larves d'épinoches et ont montré plusieurs désavantages à l'utilisation de l'E₂. D'une part, ils ont mesuré de l'E₂ à hauteur de 0.1 µg/L dans l'eau du témoin acétone ainsi que dans celle des traitements EE₂ et 17α-MT dont l'origine est probablement due à l'excrétion par les poissons. D'autre part, du fait des conditions expérimentales semi statiques, les profils des concentrations d'E₂ mesurées montraient de larges fluctuations. En effet, les concentrations dans l'eau de l'E₂ diminuaient rapidement, possiblement dues à une photo dégradation et une dégradation microbienne, à une adsorption du composé sur les parois du verre et à la matière organique, mais aussi à cause de l'absorption et le métabolisme par les poissons (Hahlbeck et al., 2004b). De plus, leurs résultats ont indiqué que 0.05 µg d'EE₂/L induit des concentrations significatives élevées ($P < 0.001$) de VTG dans les homogénats

de corps entiers des larves d'épinoches. En revanche, les deux plus fortes concentrations (concentrations nominales 1.0 et 10 µg/L) d'E₂ induisaient la même gamme de concentrations de VTG, alors que la plus basse concentration testée (concentration nominale 0.01 µg/L) n'avait aucun effet. D'autres auteurs ont également exposé à différents stades de vie des espèces de petits poissons à l'EE₂ pour induire la VTG à des concentrations nominales au dessous de 0.05 µg/L. En effet, la VTG était induite dans des tête-de-boule juvéniles à une concentration nominale de 10 ng/L (seule concentration testée) (Van Aerle et al., 2002). Dans une autre étude avec des tête-de-boule, la synthèse de VTG était induite à 16 ng/L, concentration établie comme étant la LOEC (Lange et al., 2001). Une induction dépendante de la dose de VTG a aussi été observée chez des poissons zèbres adultes à une concentration nominale aussi basse que 1.7 ng/L sous des conditions expérimentales semi statiques (Fenske et al., 2001). Des effets similaires ont été trouvés chez des poissons zèbres juvéniles exposés à une gamme de concentrations d'EE₂ dans un système semi statique et qui résultaient des concentrations élevées de VTG dans des homogénats de corps entiers à des concentrations nominales ≥ 2 ng/L (1 ng/L étant la NOEC) (Om et al., 2003). Finalement, Scholz et al. (2004) ont exposé des poissons Medaka japonais (*Oryzias latipes*) à 10 et 100 ng d'EE₂/L dans un système semi-statique où les deux concentrations ont par la suite induit la synthèse de VTG.

Effet du DHT sur la croissance des larves

Dans notre étude, nous avons observé à la fin des 42j d'expérimentation que les larves exposées au DHT avaient une longueur totale du corps plus élevée que celles des

larves exposées aux larves témoins. Cependant cet effet du DHT sur la longueur des larves n'était pas statistiquement différent des autres témoins. Une étude, administrant oralement du DHT à hauteur de 200 mg/kg à des carpes âgées de 1 an, a montré un taux de croissance élevé, un poids du corps éviscéré élevé et un contenu en protéine de la carcasse du poisson élevé (Sehgal et al., 1995). De plus, Donaldson et al. (1979) ont montré que les stéroïdes anabolites et androgéniques stimulaient la croissance des poissons. Panter et al. (2004) ont exposé des tête-de-boule au DHT (concentrations nominales de 10, 32 et 100 µg/L) et ont montré qu'il y avait une nette augmentation de la taille de la gonade mais elle n'était pas statistiquement différente. Cependant cette même étude a montré qu'une exposition au DHT ne causait aucun effet sur la croissance somatique (poids humide et longueur du corps). Une exposition au DHT in vitro chez des épinoches adultes a montré une induction du contenu de la cellule de spiggin, qui était significative à chaque concentration testée (10^{-10} , 10^{-8} et 10^{-6} M); l'augmentation maximale a toujours été observée à la concentration de 10^{-8} M (Jolly et al., 2006).

Effet de l'atrazine sur la croissance

La présente étude n'a pas pu mettre en évidence un effet significatif de l'atrazine aux 4 concentrations testées (0.1, 1, 10 et 100 µg/L) sur la mortalité et le taux de croissance des larves d'épinoches. Cependant une légère tendance de la diminution de la longueur du corps des larves a été observée après 42j d'exposition à 1, 10 et 100 µg d'atrazine/L. Une réduction significative du taux de croissance a aussi été observée chez des saumons atlantiques juvéniles après une exposition de 21j à 100 µg d'atrazine/L (Nieves-Puigdoller

et al., 2007). Également, chez des larves de tambour rouge, après 4 jours d'exposition à des concentrations de 40 et 80 µg d'atrazine/L, une diminution significative du taux de croissance de 7.9-9.8 % a été dénotée, augmentant ainsi la durée de la période larvaire fortement vulnérable (Alvarez et Fuiman, 2005). Une seconde étude chez cette même espèce a montré que les mêmes concentrations d'atrazine n'affectent pas la longueur des larves mais causent une diminution significative du poids des larves et du contenu du corps en protéines après une exposition de 8 jours (McCarty et Fuiman, 2008). Ces deux résultats démontrent qu'une exposition à l'atrazine chez des larves du tambour rouge demande un coût énergétique plus élevé résultant dans une efficacité moindre de rétention des protéines et dans des taux de croissance plus faibles. Des grenouilles exposées à de fortes concentrations (200 et 2000 µg/L) d'atrazine avaient la longueur du corps et le poids à la métamorphose réduits respectivement de 5 et 10 % par rapport aux témoins et à la plus faible concentration d'atrazine testée (20 µg/L) (Diana et al., 2000). En contraste, l'étude d'Allran et Karasov (2000), exposant des larves de grenouilles à des concentrations d'atrazine de 20 et 200 µg/L, ne montre aucun effet significatif de l'herbicide sur le taux de développement, le pourcentage de survie, et la masse à la métamorphose. Une autre étude exposant des grenouilles à des concentrations environnementales d'atrazine (1, 10 et 25 µg/L) a démontré que l'herbicide n'affectait pas la mortalité post-éclosion, la croissance larvaire et la métamorphose de *Xenopus laevis* (Carr et al., 2003). En accord avec nos résultats, l'atrazine n'affecte pas le taux de survie des têtards de *Hyla versicolor* exposés jusqu'à 2 mg/L d'atrazine (Diana et al., 2000), tout comme chez des larves de *R. pipiens*, *Rana sylvatica* et *Bufo americanus* exposées jusqu'à 20 mg/L (Allran et Karasov, 2001).

En revanche chez des saumons atlantiques juvéniles exposés à 100 µg/L, 9 % sont morts après 21j alors qu'aucune mortalité n'a été remarqué dans le traitement à 10 µg/L d'atrazine (Nieves-Puigdoller et al., 2007).

Effet du glyphosate sur la croissance

Dans notre étude, nous n'avons trouvé aucun effet du glyphosate aux concentrations 0.1, 1, 10 et 100 µg/L sur les taux de survie et de croissance des larves d'épinoches. Nos résultats sont en accord avec ceux de Mitchell et Chapman (1987), de Morgan et Kiceniuk (1992) ainsi que ceux de Huang et al. (2005) qui ont démontré que des expositions chroniques au glyphosate n'affectent pas le taux de mortalité, le taux de croissance ou la biomasse chez respectivement des saumons argentés (*Oncorhynchus kisutch*), des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et des têtes-de-Boule juvéniles (*Pimephales promelas*).

Effet de l'atrazine sur la reproduction

Malgré des résultats controversés à propos des capacités potentielles de l'atrazine d'agir comme un perturbateur endocrinien sur les espèces, des résultats (voir *Introduction avec Hayes, Crain...*) tendent à classifier l'atrazine comme un composé ressemblant aux oestrogènes. Cependant, il a été montré que l'atrazine a une interaction limitée avec la liaison du récepteur aux oestrogènes (Tennant et al., 1994; Connor et al., 1996). Chez les poissons, l'oestrogénicité des composés se liant avec les récepteurs aux oestrogènes peut être évaluée par l'induction de la VTG. Dans notre étude, aucune induction de VTG n'a été observée aux 4 concentrations testées d'atrazine (0.1, 1, 10 et 100 µg/L). Ces résultats sont

en accord avec ceux de Sanderson et al. (2001) où après une exposition de 24h à 30 μM d'atrazine aucune induction de VTG n'a été observée dans des hépatocytes de carpes mâles. Également, des poissons rouges matures exposés pendant 21 j à de fortes doses d'atrazine (100 et 1000 $\mu\text{g/L}$) n'avaient pas produit une induction de VTG (Spano et al., 2004). Bringolf et al. (2004) ont exposé des tête-de-boule adultes à des concentrations environnementales pertinentes (5 et 50 $\mu\text{g/L}$) d'atrazine pendant 21j. Les résultats ont indiqué que l'atrazine n'avait aucun effet sur la fécondité, sur le pourcentage d'éclosion, sur la survie larvaire ou sur les concentrations plasmiqes de VTG chez les poissons mâles et femelles. Murphy et al. (2006) ont collecté des grenouilles dans des zones aquatiques contaminées à l'atrazine et ont regardé la relation qui existait entre les concentrations d'atrazine mesurées et des marqueurs de reproduction. Ils en ont conclu qu'aucun des paramètres reproducteurs testés n'était significativement corrélé avec les concentrations d'atrazine.

Comme pour la VTG, aucune induction de la spiggin ne s'est produite aux 4 concentrations testées d'atrazine. De ce fait, nous pouvons en conclure, qu'avec les conditions de nos bioessais, l'atrazine n'a pas montré de propriétés oestrogéniques et androgéniques.

Effet du glyphosate sur la reproduction

Aucune induction de VTG et de spiggin n'a été observée aux 4 concentrations testées de glyphosate (0.1, 1, 10 et 100 $\mu\text{g/L}$). Nous pouvons donc conclure que le composé glyphosate n'a pas de propriétés oestrogéniques et androgéniques. Folmar et al. (1979) ont

établi que des expositions de truites arc-en-ciel à 2 mg/L de glyphosate pendant 12h n'a aucun effet aussi bien sur la fécondité que sur l'indice gonadosomatique. Plus récemment, Xie et *al.* (en 2005) ont montré qu'il n'y avait aucun changement dans les concentrations plasmiqes de VTG chez des truites arc-en-ciel juvéniles exposées à 1.64 mg/L de glyphosate comparés aux poissons témoins.

Toxicité des herbicides purs vis-à-vis de leurs produits de formulation

Dans cette étude, nous avons utilisé comme contaminants des herbicides avec une pureté supérieure à 96 %. Cependant d'autres études utilisent les produits de formulation des pesticides pour étudier leur toxicité sur les organismes.

Le Roundup est le produit de formulation du glyphosate et apparaît être plus toxique que le glyphosate pur lui-même (Folmar et al., 1979; Morgan et kiceniuk, 1992). Folmar et al. (1979) ont comparé les LC50 au bout de 96h d'exposition du produit de formulation du glyphosate avec celui du produit pur chez des poissons et invertébrés aquatiques. Ils ont mesuré une LC 50 de 96h d'exposition allant de 97 à 140 mg/L pour le glyphosate et de 2 à 50 mg/L pour le Roundup (Folmar et al., 1979). Deux autres études (Tsui et Chu, 2003 ; Bringolf et al., 2007) ont comparé la toxicité du glyphosate (sous forme d'acide), le sel d'isopropylamine de glyphosate (IPA), le Roundup et un surfactant chez des organismes microbiens et invertébrés aquatiques. Ils ont démontré que le surfactant est plus toxique que les autres composés dans l'ordre suivant : le Roundup, le glyphosate pur et l' IPA.

En ce qui concerne l'atrazine, son produit de formulation est l'Aatrex. Tout comme le glyphosate, l'Aatrex est plus toxique que le produit pur atrazine comme il a été démontré

dans des tests chroniques effectués avec des juvéniles de moules d'eau douce (Bringolf et al., 2007). En conclusion, Folmar et al. (1979) ont démontré que les fortes toxicités des produits de formulation par rapport à celles plus faibles des pesticides purs proviennent principalement de la présence du surfactant (Folmar et al., 1979).

Toxicité des mélanges de pesticides avec des surfactants (ex : NPE)

Le glyphosate, tout comme d'autres pesticides, est un composé inactif quand il est employé seul sur les cultures puisqu'il n'adhère pas aux feuilles ni ne les pénètre facilement. Pour accroître leur efficacité dans les traitements agricoles, les pesticides sont fréquemment utilisés en combinaison avec des additifs (tensioactifs) ou des surfactants afin d'améliorer leur absorption par les feuilles et la couverture foliaire. Les alkylphénols polyéthoxylates (APE), tels que les nonylphénols éthoxylates (NPE) sont souvent utilisés en mélange avec des pesticides comme des agents dispersants, détergents, émulsifiants et solubilisants. Les APE sont normalement présents dans les effluents d'eaux usées non traités et leurs produits de dégradation (les alkylphénols tels que le nonylphénol, NP) se lient au récepteur des oestrogènes (Routledge et Sumpter, 1996) et engendrent des effets oestrogéniques chez les poissons (Jobling et Sumpter, 1993; Routledge et al., 1998).

Des auteurs se sont intéressés aux effets des expositions avec des combinaisons de pesticides et leurs surfactants. Par exemple, Xie et al. (2005) a étudié les combinaisons de 4 herbicides (dont le glyphosate) avec deux surfactants chez des juvéniles de truites arc-en-ciel. Les résultats ont indiqué que pour la plupart des pesticides examinés, les combinaisons avec les surfactants contenant des APE augmentaient l'activité oestrogénique des poissons.

Ce n'est pas surprenant puisqu'il a été bien établi que les alkylphénols et même les éthoxylates induisent la VTG et active le récepteur aux œstrogènes. Également, des saumons atlantiques juvéniles exposés à un mélange de 4-NP et d'atrazine (en concentrations respectives de 5/1 et 10/2 µg/L) ont montré des différences significatives dans l'activité respiratoire $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ ainsi que dans les teneurs plasmiqes des ions Cl^- et Na^+ alors qu'il y avait aucun effet sur le taux plasmiqes de VTG et sur les performances d'hypoosmorégulation quand ces poissons sont exposés à du 4-NP seul, en concentrations environnementales de 5-20 µg/L (Moore et al., 2003). En contraste à cette étude, des truites arc-en-ciel ont été exposées continuellement durant les stades de vie embryonnaire, larvaire et juvénile pendant une année à un nonylphénol seul en concentrations de 1.05 à 10.17 µg/L et les résultats ont démontré que les concentrations de NP, typiquement trouvées dans les effluents de traitements d'eaux usées, n'ont pas affecté la différenciation sexuelle des poissons mais qu'elles ont induit la VTG chez les poissons exposés (Ackermann et al., 2002). Pour finir, une étude a examiné les réponses des paramètres du stress oxydatif chez l'épinoche à trois-épines après une exposition de 21 jours à un herbicide, le Diquat, à un adjuvant commercial, un nonylphénol polyéthoxylate et au mélange entre ces deux composés. Les résultats ont montré que l'adjuvant exerçait des effets oxydatifs plus importants que le Diquat et que les effets du mélange étaient à l'inverse de l'additivité seule (Sanchez et al., 2006).

Perspectives futures

Des améliorations futures des méthodes décrites dans ce mémoire peuvent être faites. Tout d'abord, afin d'éviter la perte du DHT après des périodes de 24h d'exposition, il faudrait soit modifier le système d'exposition et en faire un système à débit continu ou soit augmenter à la fois la concentration du DHT de quelques dizaines de $\mu\text{g/L}$ ainsi que la durée des bioessais de quelques semaines pour ainsi garantir une exposition optimale des larves d'épinoches aux androgènes.

Il existe un autre composé, le stéroïde synthétique 17β -trenbolone, dont les caractéristiques androgéniques ont été évaluées sur plusieurs espèces de poissons femelles (Dorts et al., 2009 ; Zhang et al., 2008 ; Hemmer et al., 2008 ; Seki et al., 2006 ; Jensen et al., 2006 ; Allen et al., 2008). Le 17β -trenbolone pourrait donc être un bon substitut comme contrôle positif dans ce type d'exposition, à la place du DHT. De ce fait, il serait également intéressant de comparer les caractéristiques du 17β -trenbolone avec celle du DHT sur les larves d'épinoches à trois-épines et ainsi de discuter de son potentiel comme contrôle positif pour ce bioessai.

Des tests complémentaires basés sur des épinoches, incluant des tests *in vitro* avec des embryons et des tests avec le cycle de vie entier pourraient être introduits dans le but de couvrir des effets additionnels causés par les PEs à différents niveaux biologiques.

Puisque l'épinoche à trois-épines est de plus en plus utilisée dans des études de suivi et de surveillance environnementale et qu'elle est facilement manipulable en laboratoire, sa sensibilité pourrait être quantifiée avec des substances modèles appropriées en combinaison avec l'analyse des concentrations de ces composés dans l'eau (ex. des

composés qui ont des effets connus sur d'autres poissons comme des anti-estrogènes et anti-androgènes ainsi que des inhibiteurs de l'aromatase).

Les poissons sauvages sont très souvent exposés à des mélanges de contaminants plutôt qu'à des pesticides seuls. Cependant, présentement seuls quelques auteurs ont axé leurs recherches sur les effets causés par des mélanges constitués de plusieurs « PEs » ayant des modes d'actions similaires ou différents. L'existence des effets des mélanges souligne les limitations de l'approche composé par composé communément utilisée dans l'évaluation des risques. Une telle approche pourrait sous-estimer des risques potentiels. De ce fait, il serait intéressant d'évaluer les effets de ces mélanges et aussi de savoir si les effets peuvent être prédits à partir de notre connaissance des potentiels individuels des composés.

BIBLIOGRAPHIE

- Ackermann, G.E., J. Schwaiger, R.D. Negele, K. Fent. 2002. "Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". **Aquatic Toxicology**, volume 60, numéro 3-4, pp. 203-221.
- Agence de Réglementation de la Lutte Antiparasitaire. Santé Canada. 2007. Rapport. Réévaluation de l'atrazine (évaluation environnementale). 33p.
- Allen, Y.T., P. Matthiessen, A.P. Scott, S. Haworth, S. Feist, J.E. Thain. 1999. "The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments – further surveys of flounder". **Science of the Total Environment**, volume 233, pp.5-20.
- Allen, Y.T., I. Katsiadaki, T.G. Pottinger, C. Jolly, P. Matthiessen, I. Mayer, A. Smith, A.P. Scott, P. Eccles, M.B. Sanders, K.G.T. Pulman, S. Feist, 2008. "Intercalibration exercise using a stickleback endocrine disrupter screening assay". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 27, pp. 404-412.
- Allran, J.W., W.H. Karasov, 2000. "Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed of anuran amphibians". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 19, numéro 11, pp. 2850-2855.
- Allran, J.W., W.H. Karasov, 2001. "Effects of atrazine on embryos, larvae, and adults of anuran amphibians". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 20, numéro 4, pp. 769-775.
- Alvarez, M., L.A. Fuiman. 2005. "Environmental levels of atrazine and its degradation products impair survival skills and growth of red drum larvae". **Aquatic Toxicology**, volume 74, pp. 229-241.
- Andersen, L., G.I. Petersen, Å. Gessbo, S. Örn, H. Holbech, P. Bjerregaard, L. Norrgren. 2001. "Zebrafish (*Danio rerio*) and roach (*Rutilus rutilus*): two species suitable for evaluating effects of endocrine disrupting chemicals?" **Aquatic Ecosystem Health and Management**, volume 4, numéro 3, pp. 275-282.
- Andersson, T., L. Forlin, J. Hardig, A. Larsson. 1988. "Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents". **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, volume 45, pp. 1525-1536.

- Andersson, C., I. Katsiadaki, K. Lundstedt-Enkel, J. Orberg. 2007. "Effects of 17 α -ethynylestradiol on EROD activity, spiggin and vitellogenin in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)". **Aquatic Toxicology**, volume 83, pp. 33-42.
- Ankley, G.T., K.M. Jensen, M.D. Kahl, J.J. Korte, E.A. Makynen. 2001. "Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*)". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 20, numéro 6, pp. 1276-1290.
- Baggerman, B. 1980. "Photoperiodic and endogenous control of the annual reproductive cycle in teleost fishes". **Environmental Physiology of Fishes**, pp. 533-567.
- Bejarano, A.C., G.T. Chandler. 2003. "Reproductive and developmental effects of atrazine on the estuarine meiobenthic copepod *Amphiascus tenuiremis*". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 22, numéro 12, pp. 3009-3016.
- Belfroid, A.C., A. Van der Horst, A.D. Vethaak, A.J. Schäfer, G.B.J. Rijs, J. Wegener, W.P. Cofino. 1999. "Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands". **Science of the Total Environment**, volume 225, pp. 101-108.
- Bell, A.M. 2001. "Effects of an endocrine disrupter on courtship and aggressive behaviour of male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*". **Animal Behaviour**, volume 62, pp. 775-780.
- Bell, A.M. 2004. "An endocrine disrupter increase growth and risky behavior in threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)". **Hormone and Behavior**, volume 45, pp. 108-114.
- Bjerregaard, L.B., B. Korsgaard, P. Bjerregaard. 2006. "Intersex in wild roach (*Rutilus rutilus*) from Danish sewage effluent-receiving streams". **Ecotoxicology and Environmental Safety**, volume 64, numéro 3, pp. 321-328.
- Bjorkblom, C., P.-E. Olsson, I. Katsiadaki, T. Wiklund. 2007. "Estrogen- and androgen-sensitive bioassays based on primary cell and tissue slice cultures from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)". **Comparative Biochemistry and Physiology, C**, volume 146, pp. 431-442.

- Blázquez, M., A. Felip, S. Zanuy, M. Carrillo, F. Piferrer. 2001. "Critical period of androgen-inducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass". **Journal of Fish Biology**, volume 58, pp. 342-358.
- Bon, E., U. Barbe, J.N. Rodriguez. 1997. "Plasma vitellogenin levels during the annual reproductive cycle of the female rainbow trout *oncorhynchus mykiss*: establishment and validation of an ELISA". **Comparative Biochemistry and Physiology**, B, volume 117, pp. 75-84.
- Borg, B. 1982a. "Seasonal effects of photoperiod and temperature on spermatogenesis and male secondary sexual characters in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L". **Canadian Journal of Zoology**, volume 60, pp. 3377-3386.
- Borg, B., T. Van Veen. 1982b. "Seasonal effects of photoperiod and temperature on the ovary of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L". **Canadian Journal of Zoology**, volume 60, pp. 3387-3393.
- Borg, B., J. Peute, M. Reschke, R. Van der Hurk. 1987. "Effects of photoperiod and temperature on testes, renal epithelium, and pituitary gonadotropic cells of the threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L". **Canadian Journal of Zoology**, volume 65, pp. 14-19.
- Borg, B., E. Antonopoulou, E. Andersson, T. Carlberg, I. Mayer. 1993. "Effectiveness of several androgens in stimulating kidney hypertrophy, a secondary sexual character, in castrated male three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*". **Canadian Journal of Zoology**, volume 71, pp. 2327-2329.
- Bornestaf, C., B. Borg. 2000. "Endogenous breeding cycles in male threespine sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*". **Behavior**, volume 137, pp. 921-932.
- Braga, O., G.A. Smythe, A.I. Schafer, A.J. Feitz. 2005. "Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants". **Environmental Science and Technology**, volume 39, numéro 9, pp. 3351-3358.
- Brignon, J.M., A. Gouzy. 2007. « Atrazine ». Données technico-économiques sur les substances chimiques en France. Rapport INERIS n° DRC-07-86334-03509A.
- Bringolf, R.B., J.B. Belden, R.C. Summerfelt. 2004. "Effects of atrazine on fathead minnow in a short-term reproduction assay". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 23, numéro 4, pp. 1019-1025.

- Bringolf, R.B., W.G. Cope, S. Mosher, M.C. Barnhart, D. Shea, 2007. "Acute and chronic toxicity of glyphosate compounds to glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoidea* (Unionidae)". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 26, numéro 10, pp. 2094-2100.
- Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, J.M. Porcher. 2002. "Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 21, pp.1699–1708.
- Carnevali, O., G. Mosconi, H.R. Habibi, A.C. Elia, M. Cardinali, A.M. Polzonetti-Magni. 2003. "Validation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for *Cyprinus carpio* L. vitellogenin, as a biomarker of reproductive disorders". **Chemistry and Ecology**, volume 19, pp. 5-13.
- Carr, J.A., A. Gentles, E.E. Smith, W.L. Goleman, L.J. Urquidi, K. Thuett, R.J. Kendall 2003. "Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine exposure: assessment of metamorphosis and gonadal and laryngeal morphology". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 22, numéro 2, pp. 396-405.
- Çavas, T., S. Könen. 2007. "Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay". **Mutagenesis**, volume 22, pp. 263–268.
- Chang, C.F., E.L. Lau, B.Y. Lin, S.R. Jeng. 1996. "Characterisation of vitellogenin induced by estradiol-17 β in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*". **Fish Physiology and Biochemistry**, volume 15, pp.11-19.
- Christiansen, L.B., K.L. Pedersen, S.N. Pedersen, B. Korsgaard, P. Bjerregaard. 2000. "In vivo comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screening system". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 19, pp.1867-1874.
- Cody, R.P., S.A. Bortone. 1997. "Masculinization of mosquitofish as an indicator of exposure to kraft mill effluent". **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 58, pp. 429-436.
- Comité Permanent de l'Environnement et du Développement Durable. (Page consultée le 18 Janvier 2008). Les pesticides, un choix judicieux s'impose pour protéger la santé

et l'environnement, [En ligne]. Adresse URL :
<http://cmte.parl.gc.ca/Content/HOC/committee/362/envi/reports/rp1031697/envi01/04-toc-f.html>.

- Connor, K., J. Howell, I. Chen, H. Liu, K. Berhane, C. Sciarretta, S. Safe, T. Zacharewski, 1996. "Failure of Chloro-S-triazine-derived compounds to induce estrogen receptor-mediated responses in vivo and in vitro". **Toxicological Sciences**, volume 30, numéro 1, pp. 93-101.
- Cooper, R.L., T.E. Stoker, L. Tyrey, J.M. Goldman, W.K. McElroy. 2002. "Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function". **Toxicological Sciences**, volume 53, pp. 297-307.
- Costa, M.J., D.A. Monteiro, A.L. Oliveira-Neto, F.T. Rantin, A.L. Kalinin. 2008. "Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup original®". **Ecotoxicology**, volume 17, pp. 153-163.
- Couillard, C., M. Leboeuf, R.L. Roy, C. Deblois, J. Pellerin. 2006. Rapport MPO. Concentrations of organophosphorous pesticides in critical zones of the Saint Lawrence Estuary and their toxicity to fish.
- Covens, M., L. Covens, F. Ollevier, A. De Loof. 1987. "A comparative study of some properties of vitellogenin (Vg) and yolk proteins in a number of freshwater and marine teleost fishes". **Comparative Biochemistry and Physiology**, B, volume 88, pp. 75-80.
- Crain, D.A., I.D. Spiteri, L.J. Guillette Jr. 1999. "The functional and structural observations of the neonatal reproductive system of alligators exposed in ovo to atrazine, 2,4-D, or estradiol". **Toxicology and Industrial Health**, volume 15, pp. 180-185.
- De Lorenzo, M.E, G.I. Scott, P.E. Ross. 2001. "Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 20, numéro 1, pp. 84-98.
- DeNoyelles, F., W.D. Kettle, D.E. Sinn. 1982. "The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticides in the United States". **Ecology**, volume 63, numéro 5, pp. 1285-1293.
- Denslow, N.D., M.C. Chow, K.J. Kroll, L. Green. 1999. "Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics". **Ecotoxicology**, volume 8, pp. 385-398.

- Denton, T.E., W.M. Howell., C.J. McCollum, E.B. Marks, J.J. Allison. 1985. "Masculinization of female mosquitofish by exposure to plant sterols and *Mycobacterium smegmatis*". **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, volume 35, pp. 627-632.
- De Ruiter, A.J.H., C.G. Mein. 1982. « Testosterone-dependant transformation of nephronic tubule cells into serous and mucous gland cells in stickleback kidneys *in vivo* and *in vitro* ». **General and Comparative Endocrinology**, volume 47, pp. 70-83.
- Desbrow, C., E.J. Routledge, G.C. Brighty, J.P. Sumpter, M. Waldock. 1998. "Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening". **Environmental Science and Technology**, volume 32, pp. 1549-1558.
- Diana, S.G., W.J. Resetarits Jr., D.J. Schaeffer, K.B. Beckmen, V.R. Beasley, 2000. "Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 19, numéro 12, pp. 2961-2967.
- Do Carmo Langiano, V., C.B.R. Martinez. 2008. "Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*". **Comparative Biochemistry and Physiology**, C, volume 147, pp. 222-231.
- Donaldson, E.M., H.M. Fagerkind, D.A. Higgs, J.R. McBride. 1979. "Hormonal enhancement of growth in fish". In: Hoar, W.S., J.R. Brett (Eds.), **Fish Physiology**, volume 8. Academic press, New York.
- Dorts, J., C.A. Richter, M.K. Wright-Osment, M.R. Ellersieck, B.J. Carter, D.E. Tillit, 2009. "The genomic transcriptional response of female fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an acute exposure to the androgen, 17 β -trenbolone. **Aquatic Toxicology**, volume 91, pp. 44-53.
- Durhan, E.J., C. Lambright, V. Wilson, B.C. Butterworth, O.W. Kuehl, E.F. Orlando, L.J. Gray Jr, L.E. Gray, G.T. Ankley. 2002. "Evaluation of androstenedione as an androgenic component of river water downstream of a pulp and paper mill effluent". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 21, numéro 9, pp. 1973-1976.
- Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R., Van Aerle, C. Tyler, G. Panter (...), A. Goksoyr. 2006. "Development and validation of a direct homologous quantitative

sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin". **Aquatic Toxicology**, Volume 78, pp. 202-206.

Eisler, R. 1989. "Atrazine hazards to fish, wildlife, and invertebrates : a synoptic review". **Contaminant Hazard Reviews**. Rapport n° 18. 34p.

Elia, A.C., W.T. Waller, S.J. Norton. 2002. "Biochemical Responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, *Rafinesque*) to atrazine induced oxydative stress". **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, volume 68, pp. 809-816.

Environnement Canada. (Page consultée le 18 Janvier 2008). Les produits antiparasitaires à usage agricole et l'atmosphère. Bulletin science et environnement. [En ligne]. Adresse URL : http://www.ec.gc.ca/science/sandeoct01/article3_f.html European Commission. Endocrine disrupters. (Page consultée le 02 Novembre 2008) [en ligne] http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/affect_en.htm.

Fenske, M., R. Van Aerle, S. Brack, C.R. Tyler, H. Segner, 2001. "Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals". **Comparative Biochemistry and Physiology, C**, volume 129, numéro 3, pp. 217-232.

Folmar, L.C., H.O. Sanders, A.M. Julin, 1979. "Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates". **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, volume 8, pp. 269-278.

Folmar, L.C., N.D. Denslow, V. Rao, M. Chow, D.A. Crain, J. Enblom, J. Marcino, L.J. Guillette Jr. 1996. "Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant". **Environmental Health Perspectives**, volume 104, numéro 10, pp. 1096-1101.

Fortin, M-G, C. Couillard, J. Pellerin, M. Leboeuf. 2008. "Effects of salinity on sublethal toxicity of atrazine to mummichog (*Fundulus heteroclitus*) larvae". **Marine Environmental Research**, volume 65, numéro 2, pp. 158-170.

Galloway, T.S., R.J. Brown, M.A. Browne, A. Dissanayake, D. Lowe, M.B. Jones, M.H. Depledge. 2004. "A multibiomarker approach to environmental assessment". **Environmental Science and Technology**, volume 38, pp. 1723-1731.

- Gercken, J., H. Sordyl. 2002. "Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany". **Marine Environmental Research**, volume 54, numéro 3-5, pp. 651-655.
- Gilliom, R.J., J.E. Barbash, C.G. Crawford, P.A. Hamilton, J.D. Martin, N. Nakagaki, L.H. Nowell, J.C. Scott, P.E. Stackelberg, G.P. Thelin, D.M. Wolock. 2006. The Quality of Our Nation's Waters—Pesticides in the Nation's Streams and Ground Water, 1992–2001. U.S. Geological Survey Circular 1291. 172 p.
- Gimeno, S, A. Gerritsen, T. Bowmer, H. Komen. 1996. "Feminization of male carp". **Nature**, volume 384, pp. 221-222.
- Giroux, I. 2002. Contamination de l'eau par les pesticides dans les régions de culture de maïs et de soya au Québec, Campagnes d'échantillonnage de 1999, 2000 et 2001 et évolution temporelle de 1992 à 2001. Québec : ministère de l'Environnement. Direction du suivi de l'état de l'environnement. 45 p. et 5 annexes.
- Giroux, I. 2004. La présence de pesticides dans l'eau en milieu agricole au Québec. Québec : ministère de l'Environnement. Direction du suivi de l'état de l'environnement. Envirodoq n° ENV/2004/0309, collection n° QE/151. 40 p.
- Giroux, I., C. Robert, N. Dassylva. 2006. Présence de pesticides dans l'eau au Québec : bilan dans des cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2002, 2003 et 2004, et dans des réseaux de distribution d'eau potable. Québec : ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. Direction du suivi de l'état de l'environnement. Direction des politiques de l'eau et Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. ISBN 2-550-46504-0, Envirodoq n° ENV/2006/013, collection n° QE/00173. 57p. et 5 annexes.
- Gluszczak, L., D.S. Miron, M. Crestani, M.B. da Fonseca, F. De Araujo Padron, M.F. Duarte, V.L.P. Viera. 2006. "Effects of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*)". **Ecotoxicology and Environmental Safety**, volume 65, pp. 237-241.
- Gluszczak, L., D.S. Miron, B.S. Moraes, R.R. Simões, M.R.C. Schetinger, V.M. Morsch, V.L. Loro. 2007. "Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*)". **Comparative Biochemistry and Physiology, C**, volume 146, pp. 519–524.

- Gluth, G., W. Hanke. 1985. "A comparison of physiological changes in carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pollutants at sublethal concentrations". **Ecotoxicology and Environmental Safety**, volume 9, pp. 179-188.
- Gray, LE, C. Wolf, C. Lambright, P. Mann, M. Price, R.L. Cooper, J. Ostby. 1999. "Administration of potentially antiandrogenic pesticides and toxic substances during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat". **Toxicology and Industrial Health**, volume 15, pp. 94-118.
- Graymore, M., F. Stagnitti, G. Allinson. 2001. "Impacts of atrazine in aquatic ecosystems". **Environment International**, volume 26, pp. 483-495.
- Griffiths, R., K.J. Orr, A. Adam, I. Barber. 2000. "DNA sex identification in the three-spined stickleback". **Journal of Fish Biology**, volume 57, pp. 1331-1334.
- Grobler, E., J.H.J. Van Vuren, H.H. Du Preez. 1989. "Routine oxygen consumption of *Tilapia sparrmanii* (Cichlidae) following acute exposure to atrazine". **Comparative Biochemistry and Physiology**, C, volume 93, numéro 1, pp. 37-42.
- Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. (Page consultée le 14 Janvier 2008). Pollution and degradation. [En ligne]. Adresse URL : http://www.oceansatlas.org/cds_static/en/imo_gesamp_joint_group_experts_en_438_23454.html.
- Hahlbeck, E., R. Griffiths, B.E. Bengtsson. 2004a. "The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption. I. Sexual differentiation". **Aquatic Toxicology**, volume 70, pp. 287-310.
- Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M.A. Erci, J. James, B.E. Bengtsson. 2004b. "The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption. II. Kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction". **Aquatic Toxicology**, volume 70, pp. 311-326.
- Handy, R.D., T. Runnalls, P.M. Russel. 2002. "Histopathologic biomarkers in three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in Southern England that meet the freshwater fisheries directive". **Ecotoxicology**, volume 11, pp. 467-479.
- Hashimoto, S., H. Bessho, A. Hara, M. Nakamura, T. Iguchi, K. Fujita. 2000. "Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder

- (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan". **Marine Environmental Research**, volume 49, pp. 37-53.
- Hayes, B.T., A. Collins, M. Lee, M. Mendoza, N. Noriega, A.A. Stuart, A. Vonk. 2002. "Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, volume 99, numéro 8, pp. 5476-5480.
- Hecker, M., C.R. Tyler, M. Hoffmann, S. Maddix, L. Karbe. 2002. "Plasma biomarkers in fish provide evidence for endocrine modulation in the Elbe river, Germany". **Environmental Science and Technology**, volume 36, pp. 2311-2321.
- Hemmer, M.J., G.M. Cripe, B.L. Hemmer, L.R. Goodman, K.A. Salinas, J.W. Fournie, C.C. Walker, 2008. "Comparison of estrogen-responsive plasma protein biomarkers and reproductive endpoints in sheepshead minnows exposed to 17 β -trenbolone". **Aquatic toxicology**, volume 88, pp. 128-136.
- Hoar, W.S. 1963. "Hormones and the reproductive behaviour of the male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)". **Animal behaviour**, volume 10, numéro 3-4, pp. 247-266.
- Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, P. Bjerregaard. 2001. "Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)". **Comparative Biochemistry and Physiology**, C., volume 130, pp.119-131.
- Holm, G., L. Norrgren, O. Linden. 1991. "Reproductive and histopathological effects of long-term experimental exposure to bis(tributyl)oxide (TBTO) on the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L". **Journal of Fish Biology**, volume 38, pp. 373-386.
- Holm, G., L. Norrgren, T. Andersson, A. Thuren. 1993. "Effects of exposure to food contaminated with PBDE, PCN or PCB on reproduction, liver morphology and cytochrome P450 activity in the threespined stickleback *Gasterosteus aculeatus*". **Aquatic Toxicology**, volume 27, pp.33-50.
- Holm, G., J. Lundstrom, T. Andersson, L. Norrgren. 1994. "Influences of halogenated organic substances on ovarian development and hepatic EROD activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*". **Aquatic Toxicology**, volume 29, pp.241-256.

- Howell, W.M., D.A. Black, S.A. Bortone. 1980. "Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: evidence for environmentally induced masculinization". **Copeia**, volume 4, pp. 43-51.
- Howell, W.M., Denton T.E. 1989. "Gonopodial morphogenesis in female mosquitofish, *Gambusia Affinis-Affinis*, masculinized by exposure to degradation products from plant sterols". **Environmental Biology of Fishes**, volume 24, numéro 1, pp. 43-51.
- Huang, X., S. Fong, L. Deanovic, T.M. Young, 2005. "Toxicity of herbicides in highway runoff". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 24, numéro 9, pp. 2336-2340.
- Hussein, S.Y., M.A. El-Nasser, S.M. Ahmed. 1996. "Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, Egypt". **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, volume 57, pp. 503-510.
- Jakobsson, S., B. Borg, C. Haux, S.J. Hyllner. 1999. "An 11-ketotestosterone induced kidney-secreted protein : the nest building glue from male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*". **Fish physiology and Biochemistry**, volume 20, pp. 79-85.
- Jenkins, R., R.A. Angus, H. McNatt, W.M. Howell, J.A. Kemppainen, M. Kirk, E.M. Wilson. 2001. "Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 20, numéro 6, pp. 1325-1331.
- Jenkins, R.L., E.M. Wilson, R.A. Angus, W.M. Howell, M. Kirk. 2003. "Androstenedione and progesterone in the sediment of a river receiving paper mill effluent". **Toxicological Sciences**, volume 73, pp. 53-59.
- Jensen, K.M., E.A. Makynen, M.D. Kahl, G.T. Ankley, 2006. Effects of the feedlot contaminant 17 β -trenbolone on reproductive endocrinology of the fathead minnow". **Environmental Science and Technology**, volume 40, pp. 3112-3117.
- Jiraungkoorskul, W., E.S. Upathama, M. Kruatrachuea, S. Sahaphongc, S. Vichasri-Gramsa, P. Pokethitiyooka. 2002. "Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)". **Science of Asia**, volume 28, pp. 121-127.

- Jiraungkoorskul, W., E.S. Upatham, M. Kruatrachue, S. Sahaphong, S. Vichasri-Grams, P. Pokethitiyook. 2003. "Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide Roundup on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)". **Environmental Toxicology**, volume 18, pp. 260–267.
- Jobling, S., J.P. Sumpter, 1993. "Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes". **Aquatic Toxicology**, volume 27, numéro 3-4, pp. 361-372.
- Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, J.P. Sumpter. 1996. "Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkyl-phenolic chemicals". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 15, pp. 194-202.
- Jobling, S., M. Nolan, C.R. Tyler, G. Brighty, J.P. Sumpter. 1998. "Widespread sexual disruption in wild fish". **Environmental Science and Technology**, volume 32, pp. 2498–2506.
- Johnson, A.C., H.R. Aerni, A. Gerritsen, M. Gibert, W. Giger, K. Hylland, M. Jurgens, T. Nakari, A. Pickering, M.J. Suter, A. Svenson, F.E. Wettstein. 2005. "Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices". **Water Research**. volume 39, numéro 1, pp. 47-58.
- Jolly, C., I. Katsiadaki, N. Le Belle, I. Mayer, S. Dufour. 2006. "Development of a stickleback kidney cell culture assay for the screening of androgenic and anti-androgenic endocrine disrupters". **Aquatic Toxicology**, volume 79, pp. 158-166.
- Jones, I., C. Lindberg, S. Jakobsson, A. Hellqvist, U. Hellman, B. Borg, P.E. Olsson. 2001. "Molecular cloning and characterisation of spiggin. An androgen-regulated extraorganismal adhesive with structural similarities to Von Willebrand factor-related proteins". **Journal of Biochemistry and Chemistry**, volume 276, pp. 17857-17863.
- Katsiadaki, I., A.P. Scott, M.R. Hurst, P. Matthiessen, I. Mayer. 2002a. "Detection of environmental androgens: a novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 21, pp. 1946-1954.
- Katsiadaki, I., A.P. Scott, I. Mayer. 2002b. "The potential of the threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a combined biomarker for oestrogens and androgens in

European waters". **Marine Environmental Research**, volume 54, numéro 3-5, pp. 725-728.

Katsiadaki, I., S. Morris, C. Squires, M.R. Hurst, J.D. James, A.P. Scott. 2006. "Use the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as a sensitive *in vivo* test for detection of environmental antiandrogens". **Environmental Health Perspectives**, volume 114, suppl. 1, pp. 115-121.

Kettles, M.A., S.R. Browning, T.S. Prince, S.W. Horstman. 1997. "Triazine herbicide exposure and breast cancer incidence: an ecological study of Kentucky counties". **Environmental Health Perspectives**, volume 105, pp. 1222-1227.

Kime, DE, J.P. Nash, A.P. Scott. 1999. "Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics". **Aquaculture**, volume 177, pp. 345-352.

Kishida, M., T.R. Anderson, J.L. Specker. 1992. "Induction by β -estradiol of vitellogenin in striped bass *Morone saxatilis*: characterisation and quantification in plasma and mucus". **General Comparative and Endocrinology**, volume 88, pp.29-39.

Knudsen, F.R., A.E. Scho, M.L. Wiborg, E. Mona, K.E. Tollefsen, J. Stenersen, J.P. Sumpter. 1997. "Increase of plasma vitellogenin concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to effluents from oil refinery treatment works and municipal sewage". **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, volume 59, pp. 802-806.

Kolodziej, E.P., J.L. Gray, D.L. Sedlak. 2003. "Quantification of steroid hormones with pheromonal properties in municipal wastewater effluent". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 22, numéro 11, pp. 2622-2629.

Kolodziej, E.P., T. Harter, D.L. Sedlak. 2004. "Dairy wastewater, aquaculture, and spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment". **Environmental Science and Technology**, volume 38, numéro 23, pp. 6377-6384.

Kolpin, D.W., E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton. 2002. "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance". **Environmental Science and Technology**, volume 36, pp. 1202-1211.

Komen, J., P.A.J. Loddera, F. Huskensa, C.J.J. Richtera, E.A. Huisman. 1989. "Effects of oral administration of 17[alpha]-methyltestosterone and 17[beta]-estradiol on gonadal

- development in common carp, *Cyprinus carpio* L". **Aquaculture**, volume 78, numéro 3-4, pp. 349-363.
- Korsgaard, B., K.L. Pedersen. 1998. "Vitellogenin in *Zoarces viviparus*: Purification, quantification by ELISA and induction by estradiol-17 β and 4-nonylphenol". **Comparative Biochemistry and Physiology, C**, Volume 120, numéro 1, pp. 159-166.
- Länge, R., T.H. Hutchinson, C.P. Croudace, F. Siegmund, H. Schweinfurth, P. Hampe, G.H. Panter, J.P., Sumpster, 2001. "Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*)". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 20, numéro 6, pp. 1216-1227.
- Larsson, D.G.J., H. Hallman, L. Förlin. 2000. "Skewed embryonic sex ratios in a viviparous fish: a result of endocrine disruption?" **Marine Environmental Research**, volume 50, numéro 1-5, pp. 191-192.
- Larsson, D.G.J., L. Förlin. 2002. "Male-biased sex ratios of fish embryos near a pulp mill: temporary recovery after a short-term shutdown". **Environmental Health Perspectives**, volume 110, numéro 8, pp. 739-742.
- Liney, K.E., S. Jobling, J.A. Shears, P. Simpson, C.R. Tyler. 2005. "Assessing the sensitivity of different life stages to effluents from wastewater treatment works". **Environmental Health Perspectives**, volume 113, pp. 1299-1307.
- Luckenbach, T., R. Triesbskorn, E. Muller, A. Oberemm. 2001. "Toxicity of waters from two streams to early life stages of brown trout (*Salmo trutta* f. *fario* L.), tested under semi-field conditions". **Chemosphere**, volume 45, pp. 571-579.
- Lye, C.M., C.L.J. Frid, M.E. Gill, D. McCormick. 1997. "Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works". **Marine Pollution Bulletin**, volume 34, numéro 1, pp. 34-41.
- Makynen, E.A., M.D. Kahl, K.M. Jensen, J.E. Tietge, K.L Wells, G. Van der Kraak, G.T. Ankley. 2000. "Effects of the mammalian antiandrogen vinclozolin on development and reproduction of the fathead minnow (*Pimephales promelas*)". **Aquatic Toxicology**, volume 48, pp. 461-475.

- Marc, J., O. Mulner-Lorillon, S. Boulben, D. Hureau, G. Durand, R. Bellé. 2002. "Pesticide Roundup provokes cell Division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation". **Chemical Research and Toxicology**, volume 15, pp. 326-331.
- McCarthy, I.D., L.A. Fuiman. 2008. "Growth and protein metabolism in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae exposed to environmental levels of atrazine and malathion". **Aquatic Toxicology**, volume 88, pp. 220-229.
- Matthiessen, P., Y.T. Allen, C.R. Allchin, S.W. Feist, M.F. Kirby, R.J. Law, A.P. Scott, J.E. Thain, K.V. Thomas. 1998. Oestrogenic endocrine disruption in flounder (*Platichthys flesus* L.) from United Kingdom estuarine and marine waters. Science Series Technical Report 107, CEFAS – The Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science, Lowestoft, pp. 48.
- Matthiessen, P. 2002. Endocrine Disruption in the marine Environment. Rapport. 67p.
- Mayer, I., B. Borg, R. Schulz. 1990a. "Conversion of 11-ketoandrostenedione to 11-ketotestosterone by blood cells of six fish species". **General and Comparative Endocrinology**, volume 77, pp. 70-74.
- Mellanen, P., M. Soimasou, B. Holmbom, A. Oikari, R. Santti. 1999. "Expression of the vitellogenin gene in the liver of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus*) exposed to effluents from pulp and paper mills". **Ecotoxicology and Environmental Safety**, volume 43, pp. 133-137.
- Mitchell, D.G., P.M. Chapman, 1987. "Seawater challenge testing of coho salmon smolts following exposure to Roundup herbicide". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 6, pp. 875-878.
- Moore, A., C.P. Waring. 1998. "Mechanistic effects of a triazine pesticide on reproductive endocrine function in mature Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr". **Pesticide Biochemistry and Physiology**, volume 62, numéro 1, pp. 41-50.
- Moore, A., A.P. Scott, N. Lower, I. Katsiadaki, L. Greenwood, 2003. "The effects of 4-nonylphenol and atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar* L)". **Aquaculture**, volume 222, numéro 1-4, pp. 253-263.
- Morgan, M.J., J.W. Kiceniuk, 1992. "Response of rainbow trout to a two month exposure to Vision, a glyphosate herbicide". **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, volume 48, pp. 772-780.

- Mori, T., H. Matsumoto, H. Yokota, 1998. "Androgen-induced vitellogenin gene expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes". **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, volume 67, numéro 2, pp. 133-141.
- Murphy, M.B., M. Hecker, K.K. Coady, A.R. Tompsett, E.B. Higley, P.D. Jones, L.H. Du Preez, (...), J.P. Giesy. 2006. "Plasma steroid hormone concentrations, aromatase activities and GSI in ranid frogs collected from agricultural and non-agricultural sites in Michigan (USA)". **Aquatic Toxicology**, volume 77, numéro 2, pp. 153-166.
- Mylchreest, E., S. Snajdr, J.J. Korte, G.T. Ankley. 2003. "Comparison of ELISAs for detecting vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)". **Comparative Biochemistry and Physiology, C**, volume 134, pp.251-257.
- Neskovic, N.K., I. Elezovic, V. Karan, V. Poleksic, M. Budimir. 1993. "Acute et subacute toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus carpio* L.)". **Ecotoxicology and Environmental Safety**, volume 25, pp. 173-182.
- Neskovic, N.K., V. Poleksic, I. Elezovic, V. Karan, M. Budimir. 1996. "Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp (*Cyprinus carpio*)". **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, volume 56, pp. 295-302.
- Nieves-Puigdollers, K., B.T. Bjornsson, S.T. McCormick. 2007. "Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in atlantic salmon". **Aquatic Toxicology**, volume 84, pp. 27-37.
- Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S-I. Kristiansen, F. Brion, J-M. Porcher, A. Goksoyr. 2004. "Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening". **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, volume 378, pp. 621-633.
- Nolan, M, S. Jobling, G. Brighty, J.P. Sumpter, C.R. Tyler. 2001. "A histological description of intersexuality in the roach". **Journal of Fish Biology**, volume 58, pp. 160-176.
- Örn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, G.I. Petersen. 2003. "Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone". **Aquatic Toxicology**, volume 65, numéro 4, pp. 397-411.
- Oulmi, Y., R.D. Negele, T. Braunbeck. 1995. "Segment specificity of the cytological response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) renal tubules following prolonged

- exposure to sublethal concentrations of atrazine". **Ecotoxicology and Environmental Safety**, volume 32, pp. 39-50.
- Pall, M.K., I. Mayer, B. Borg. 2002b. "Androgen and behavior in the male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. II. Castration and 11-ketoandrostenedione effects on courtship and parental care during the nesting cycle". **Hormone and Behavior**, volume 42, pp. 337-344.
- Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, C.R. Tyler. 2004. "Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development". **Aquatic Toxicology**, volume 70, numéro 1, pp. 11-21.
- Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. Leblanc, C.V. Sullivan. 1999. "Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds". **Comparative Biochemistry and Physiology, C.**, volume 123, pp. 113-125.
- Parks, L.G., C.S. Lambright, E.F. Orlando, L.J. Guillette, G.T. Ankley, L.E. Gray Jr. 2001. "Masculinization of female mosquitofish in kraft mill effluent-contaminated Fenholloway River water is associated with androgen receptor agonist activity". **Toxicological Sciences**, volume 62, pp. 257-267.
- Peakall, D.B. 1994. "The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction". **Ecotoxicology**, volume 3, pp. 157-160.
- Peichel, C.L., J. A. Ross, C. K. Matson, M. Dickson, J. Grimwood, J. Schmutz, R. M. Myers, S. Mori, D. Schluter, D. M. Kingsley. 2004. "The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome". **Current Biology**, volume 14, pp. 1416-1424.
- Petersson, M., E. Hahlbeck, I. Katsiadaki, L. Asplund, B.E. Bengtsson. 2007. "Survey of estrogenic and androgenic disruption in Swedish coastal waters by the analysis of bile fluid from perch and biomarkers in the three-spined stickleback". **Marine Pollution Bulletin**, volume 54, pp. 1868-1880.
- Pottinger, TG, TR. Carrick, WE. Yeomans. 2002. "The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices". **Journal of Fish Biology**, volume 61, pp.207-229.

- Prasad, T.A.V., T. Srinivas, G.M. Rafi, D.C. Reddy. 1990. "Chronic effect of atrazine on hydromineral balance in the crab". **Biochemistry International**, volume 22, numéro 3, pp. 435-440.
- Prasad, T.A.V., T. Srinivas, G.M. Rafi, D.C. Reddy. 1991. "Effect *in vivo* of atrazine on haematology and O₂ consumption in fish, *Tilapia mossambica*". **Biochemistry International**, volume 23, numéro 3, pp. 157-161.
- Purdom, C.E., P.A. Hardiman, V.J. Bye, N.C. Eno, C.R. Tyler, J.P. Sumpter. 1994. "Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works". **Chemical Ecology**, volume 8, pp. 275-285.
- Richard, S., S. Moslemi, H. Sipahutar, N. Benachour, G.E. Seralini. 2005. "Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase". **Environmental Health Perspectives**, volume 113, numéro 6, pp. 716-720.
- Rodgers-Gray, T.P., S. Jobling, C. Kelly, S. Morris, G. Brighty, M.J. Waldock, J.P. Sumpter, C.R. Tyler. 2001. "Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose dependent and persistent disruption in gonadal duct development". **Environmental Science and Technology**, volume 35, numéro 3, pp. 462-470.
- Rodriguez, J.N., O. Kah, M. Geffard, F.L. Menn. 1989. "Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. for sole *Solea, vulgaris* vitellogenin". **Comparative Biochemistry and Physiology**, B., volume 92, pp. 741-746.
- Roussel, H., S. Joachim, S. Lamothe, O. Palluel, L. Gauthier, J-M. Bonzom. 2007. "A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms: individual and population responses of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*)". **Aquatic Toxicology**, volume 82, pp. 272-280.
- Routledge, E.J., J.P. Sumpter. 1996. "Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 15, numéro 3, pp. 241-248.
- Routledge, E.J., J. Parker, J. Odum, J. Ashby, J.P. Sumpter. 1998. "Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic". **Toxicology and Applied Pharmacology**, volume 153, numéro 1, pp. 12-19.
- Roy, R.L., Y. Morin, S.C. Courtenay, P. Robichaud. 2004. "Purification of vitellogenin from smooth flounder (*Pleuronectes putnami*) and measurement in plasma by

- homologous ELISA". **Comparative Biochemistry and Physiology**, B., volume 139, pp. 235-244.
- Sadovy, Y., D.Y. Shapiro. 1987. "Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes". **Copeia**, pp. 136-156.
- Saglio, P., S. Trijasse. 1998. "Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish". **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, volume 35, numéro 3, pp. 484-491.
- Sanchez, W., O. Palluel, L. Meunier, M. Coquery, J.M. Porcher, S. Aït-Aïssa. 2005. "Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels". **Environmental Toxicology and Pharmacology**, volume 19, pp. 177-183.
- Sanchez, W., O. Palluel, L. Lagadic, S. Aït-Aïssa, J.M. Porcher. 2006. "Biochemical effects of nonylphenol polyethoxylate adjuvant, Diquat herbicide and their mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.)". **Marine Environmental Research**, volume 62, pp. S29-S33.
- Sanchez, W., S. Aït-Aïssa, O. Palluel, J.M. Ditch, J.M. Porcher. 2007. "Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams". **Ecotoxicology**, volume 16, pp. 279-287.
- Sanchez, W., C. Goin, F. Brion, P.E. Olsson, A. Goksøyr, J.M. Porcher. 2008a. "A new ELISA for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin, using antibodies against synthetic peptide". **Comparative Biochemistry and Physiology**, C., volume 147, pp. 129-137.
- Sanchez, W., I. Katsiadaki, B. Piccini, J.M. Ditch, J.M. Porcher. 2008b. "Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: a multiparametric approach". **Environment International**, volume 34, numéro 4, pp. 490-498.
- Sanchez, W., B. Piccini, J.M. Ditch, J.M. Porcher. 2008c. "Assessment of seasonal variability of biomarker in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring". **Environment International**, volume 34, pp. 791-798.

- Sanderson, J.T., W. Seinen, J.P. Giesy, M. Van den Berg. 2000. "2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity ?" **Toxicological Sciences**, volume 54, pp. 121-127.
- Sanderson, J.T., R.J. Letcher, M. Heneweer, J.P. Giesy, M. Van den Berg. 2001. "Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes". **Environmental Health Perspectives**, volume 109, pp. 1027-1031.
- Santé Canada. 1995. Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada - Le glyphosate. Rapport. 5p. [En ligne] <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/glyphosate/index-fra.php>
- Scholz, S., Kordes, C., Hamann, J., Gutzeit, H.O. 2004. "Induction of vitellogenin in vivo and in vitro in the model teleost medaka (*Oryzias latipes*): Comparaison of gene expression and protein levels". **Marine Environmental Research**, volume 57, numéro 3, pp. 235-244.
- Sebire, M., I. Katsiadaki, A.P. Scott. 2007. "Non-invasive measurement of 11-ketotestosterone, cortisol and androstenedione in male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)". **General and Comparative Endocrinology**, volume 152, pp. 30-38.
- Sehgal, G.K., P.K. Saxena, H.S. Sehgal, 1995. "Hormonal control of sex in common carp and its application to composite fish culture". **Aquaculture**, volume 129, pp. 215-219.
- Seki, M., S. Fujishima, T. Nosaka, M. Maeda, K. Kobayashi, 2006. "Comparison of response to 17 β -estradiol and 17 β -trenbolone among three small fish species". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 25, pp. 2742-2752.
- Servos, M.R., D.T. Bennie, B.K. Burnison, A. Jurkovic, R. McInnis, T. Neheli, A. Schnell, P. Seto, S.A. Smyth, T.A. Ternes. 2005. "Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and 3 α -estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants". **Science of the Total Environment**, volume 336, numéro 1-3, pp. 155-170.
- Sherry, J., A. Gamble, M. Fielden, P. Hodson, B. Burnison, K. Solomon. 1999. "An ELISA for brown trout, *Salmo trutta*, vitellogenin and its use in bioassays for environmental estrogens". **Science of the Total Environment**, volume 225, pp.13-31.

- Shore, L.S., O. Reichmann, M. Shemesh, A. Wenzel, M.I. Litaor. 2004. "Washout of accumulated testosterone in a watershed". **Science of the Total Environment**, volume 332, numéro 1-3, pp. 193-202.
- Solé, M., D. Barcelo, C. Porte. 2002. "Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants". **Aquatic Toxicology**, volume 60, numéro 3-4, pp. 233.
- Solomon, K.R., D.B. Baker, R.P. Richards, K.R. Dixon, S.J. Kaune, T.W. La Point, R.J. Kendall, C.P. Weisskopf, J.M. Giddings, G.P. Giesy, L.W. Hall, Jr., W.M. Williams. 1996. "Ecological risk assessment of atrazine in north american surface waters". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 15, numéro 1, pp. 31-76.
- Sonnenschein, C., A.M. Soto. 1998. "An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists". **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, volume 65, numéro 1-6, pp. 143-150.
- Spano, L., C.R. Tyler, R. Van Erle, P. Devos, S.N.M. Mandiki, F. Sylvestre, J-P. Thomé, P. Kestemont. 2004. "Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*)". **Aquatic Toxicology**, volume 66, pp. 369-379.
- Steinberg, C.E.W., R. Lorenz, O.H. Spieser. 1995. "Effects of atrazine on swimming behaviour of zebrafish, *Brachydanio rerio*". **Water Resaerch.**, volume 29, numéro 3, pp. 981-985.
- Stoker, T.E., C.L. Robinette, R. Cooper. 1999. "Maternal exposure to atrazine during lactation suppresses suckling-induced prolactin release and results in prostatitis in the adult offspring". **Toxicological Sciences**, volume 52, pp. 68-79.
- Sturm, A., J. Wogram, PD. Hansen, M. Liess. 1999. "Potential use of cholinesterase in monitoring low levels of organophosphates in small streams: natural variability in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and relation to pollution". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 18, pp.194-200.
- Sturm, A., J. Wogram, H. Segner, M. Liess. 2000. "Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 19, pp. 1607-1615.

- Sumpter, J.P., S. Jobling. 1995. "Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment". **Environmental Health Perspectives**, volume 103, pp. 173-178.
- Svenson, A., A.S. Allard. 2004. "In vitro androgenicity in pulp and paper mill effluents". **Environmental Toxicology**, volume 19, numéro 5, pp. 510-517.
- Swarup, H., 1958. "Stages in the development of the stickleback *Gasterosteus aculeatus* (L.)". **Journal of Embryology Experimental and Morphology**, volume 6, Part 3, pp. 373-383.
- Swarup, H., 1959. "The reproductive cycle and development of the gonads in *Gasterosteus aculeatus* (L.)". **Proceedings of Zoology Social**, volume 11, numéro 1, pp.47-55.
- Sylvestre, F., G. Trausch, L. Spano, P. Devos. 2002. "Effects of atrazine on osmoregulation in the chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*". **Comparative Biochemistry and Physiology**, C, volume 132, pp. 385-390.
- Szarek, J., A. Siwick, A. Andrzejewska, E. Terech-Majewska, T. Banaszkiewics. 2000. "Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*)". **Marine Environmental Research**, volume 50, pp. 236-266.
- Tamura, H., S.C. Maness, K. Reischmann, D.C. Dorman, L.E. Gray, K.W. Gaido. 2001. "Androgen receptor antagonism by the organophosphate insecticide fenitrothion". **Toxicological Sciences**, volume 60, pp. 56-62.
- Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, T. Igushi. 2004. "Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka". **Journal Health Sciences**, volume 50, pp. 301-308.
- Tate, T.M., J.O. Spurlock, F.A. Christian. 1997. "Effect of glyphosate on the development of *Pseudosuccinea columella* snails". **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, volume 33, pp. 286-289.
- Tavera-Mendoza, L., S. Ruby, P. Brousseau, M. Cyr, D. Marcogliese. 2002. "Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 21, pp. 527-531.
- Tellier, S. 2006. Les pesticides en milieu agricole : état de la situation environnementale et initiatives prometteuses. Québec : ministère du Développement durable, de

l'Environnement et des Parcs. Direction des politiques en milieu terrestre. Service des pesticides. 90 p.

- Tennant, M.K., D.S. Hill, J.C. Eldridge, L.T. Wetzel, C.B. Breckenridge, J.T. Stevens, 1994. "Chloro-s-triazine antagonism of estrogen action: limited interaction with estrogen receptor binding". **Journal of Toxicology and Environmental Health**, volume 43, numéro 2, pp. 197-211.
- Ternes, T.A., M. Stumpf, J. Mueller, K. Haberer, R.D. Wilken, M. Servos. 1999. "Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants -I. Investigations in Germany, Canada and Brazil". **Science of the Total Environment**, volume 225, pp. 81-90.
- Triebkorn, R., J. Bohmer, T. Braunbeck, W. Honnen, H.R. Kohler, R. Lehmann, A. Oberemm, J. Schwaiger, H. Segner, G. Schuurmann, W. Traunspurger. 2001. "The project VALIMAR (VALIDation of bioMARKers for the assessment of small stream pollution): objectives, experimental design, summary of results, and recommendations for the application of biomarkers in risk assessment". **Journal of Aquatic Ecosystem and Stress Recovery**, volume 8, pp. 161-178.
- Tremblay, L., G. Van der Kraak. 1999. "Comparison between the effects of the phytosterol β -sitosterol and pulp and paper mill effluents on sexually immature rainbow trout". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 18, numéro 2, pp. 329-336.
- Thomas, K.V., M.R. Hurst, P. Matthiessen, M. McHugh, A. Smith, M.J. Waldock. 2002. "An assessment of in vitro androgenic activity and the identification of environmental androgens in United Kingdom estuaries". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 21, numéro 7, pp. 1456-1461.
- Toppari, J., J.C. Larsen, P. Christiansen, A. Giwercman, P. Grandjean, L.J. Guilette Jr, B. Jégou, T.K. Jensen, P. Jouannet, N. Keiding, H. Leffers, J.A. McLachlan, O. Meyer, J. Muller, E. Rajpert-DE Meyts, T. Scheike, R. Sharpe, J. Sumpter, N.E. Skakkebaek. 1996. "Male reproductive health and environmental xenoestrogens". **Environmental Health Perspectives**, Suppl., volume 104, pp. 741-803.
- Tsui, M.T.K., L.M. Chu. 2003. "Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors". **Chemosphere**, volume 52, pp. 1189-1197.

- Tyler, CR, E.J. Routledge. 1998. "Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation". **Pure Application Chemistry**, volume 70, pp. 1795-1804.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2002. Reregistration eligibility science chapter for atrazine environmental fate and effects chapter. Washington, DC, USA.
[En ligne] Adresse URL :
http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/atrazine/efed_redchap_22apr02.pdf
- Van Aerle, R., T.M. Nolan, S. Jobling, L.B. Christiansen, J.P. Sumpter, C.R. Tyler. 2001. "Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the Gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 20, numéro 12, pp. 2841-2847.
- Van Aerle, R., N. Pounds, T.H. Hutchinson, S. Maddix, C.R. Tyler. 2002. "Window of sensitivity for the estrogenic effects of ethinylestradiol in early life-stages of fathead minnow, *Pimephales promelas*". **Ecotoxicology**, volume 11, numéro 6, pp. 423-434.
- Van den Heuvel, M.R., R.J. Ellis. 2002. "Timing of exposure to a pulp and paper effluent influences the manifestation of reproductive effects in rainbow trout". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 21, numéro 11, pp. 2338-2347.
- Van der Oost, R., J. Beyer, N.P.E. Vermeulen. 2003. "Fish accumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review". **Environmental Toxicology and Pharmacology**, volume 13, pp. 57-149.
- Vethaak, A.D., G.B.J. Rijs, S.M. Schrap, H. Ruiter, A. Gerritsen, J. Lahr. 2002. "Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands, Occurrence, potency and biological effects". Dutch National Institute of Inland Water Management and Waste Water Treatment (RIZA) and the Dutch National Institute for Coastal and Marine Management (RIKZ), *RIZA/RIKZ report no. 2002.001, February 2002*, ISBN 9036954010.
- Vigano, L., A. Arillo, S. Bottero, A. Massari, A. Mandich. 2001. "First observation of intersex cyprinids in the Po River (Italy)". **Science of the Total Environment**, volume 269, pp. 189-194.
- Wibe, A.E., T. Nordtug, B.M. Jenssen. 2001. "Effects of bis(tributyltin)oxide on antipredator behavior in threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* L". **Chemosphere**, volume 44, pp. 475-481.

- Wibe, A.E., A. Billing, G. Rosenqvist, B.M. Jenssen. 2002a. "Butyl benzyl phthalate affects shoaling behavior and bottom-dwelling behavior in Threespine stickleback". **Environmental Research**, volume 89, pp. 180-187.
- Wibe, A.E., G. Rosenqvist, B.M. Jenssen. 2002b. "Disruption of male reproductive behavior in threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* exposed to 17 β -estradiol". **Environmental Research**, volume 90, pp. 136-141.
- Wiegand, C., E. Krause, C. Steinberg, S. Pflugmacher. 2001. "Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*)". **Ecotoxicology and Environmental Safety**, volume 49, pp. 199-205.
- Wiklund, T., L. Lounasheimo, J. Lom, G. Bylund. 1996. "Gonadal impairment in roach *Rutilus rutilus* from Finnish coastal areas of the northern Baltic Sea". **Diseases of Aquatic Organisms**, volume 26, pp. 163-171.
- Whoriskey, F.G., G.J. Fitzgerald. 1989. "Breeding-season habitat use by sticklebacks (Pisces: Gasterosteidae) at Isle Verte, Quebec". **Canadian Journal of Zoology**, volume 67, pp. 2126-2130.
- Wogram, J., A. Sturm, H. Segner, M. Liess. 2001. "Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carboxylesterase in threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short term exposure". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 20, pp.1528-31.
- Xie, L., K. Thrippleton, M.A. Irwin, G.S. Siemering, A. Mekebri, D. Crane, K. Berry, D. Schlenk, 2005. "Evaluation of estrogenic activities of aquatic herbicides and surfactants using an rainbow trout vitellogenin assay". **Toxicological Sciences** volume 87, numéro 2, pp. 391-398.
- Zhang, X., M. Hecker, J.-W. Park, A.R. Tompsett, P.D. Jones, J. Newsted, D.W.T. Au, R. Kong, R.S.S. Wu, J.P. Giesy, 2008. "Time-dependent transcriptional profiles of genes of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to fadrazolle and 17 β -trenbolone". **Environmental Toxicology and Chemistry**, volume 27, pp. 2504-2511.

